Model preclinic de nouă generație pentru evaluarea rolului terapeutic a microARN-205-5p în limitarea metastazei în melanom - MELAMIR

Titlul proiectului: Model preclinic de nouă generație pentru evaluarea rolului terapeutic a microARN-205-5p în limitarea metastazei în melanom

Acronim: MELAMIR

Competiție: P1 - Dezvoltarea sistemului național de CD - Proiect de cercetare postdoctorală (PD)

Cod proiect: PN-III-P1-1.1-PD-2019-0631

Durată proiect: 24 luni (01/09/2020 - 31/08/2022)

Buget: 246.950,00

Coordonator: Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca – RO, Departament – Centrul de Cercetări pentru Medicină Avansată – MedFUTURE

Director proiect: Dr. Diana (Gulei) Tomuleasa

Motivația proiectului

Melanomul malign este cel mai frecvent tip de cancer de piele și are cea mai mare rată de mortalitate dintre toate cancerele dermatologice. Dacă rata de supraviețuire pentru 5 ani în cazul pacienților cu melanom localizat (fără metastaze) este de peste 90%, pe măsură ce cancerul progresează la melanom invaziv și formează metastaze, rata de supraviețuire scade drastic la 16%. Dobândirea de fenotipuri invazive și pierderea contactului cu celulele din jur în tumora primară sunt considerate primele evenimente în ceea ce privește progresia către stadiile târzii și sunt corelate pozitiv cu capacitatea de metastazare. Prin urmare, există o dependență strictă între supraviețuirea pacienților și caracterul invaziv a melanocitelor maligne. Astfel, poriectul de cercetare postdoctorala isi propune prevenirea sau încetinirea procesului de invazie ca mijloc de management terapeutic a acestui tip de cancer foarte agresiv.

Obiectivele proiectului

Rezultatele preliminare ale directorului de proiect au demonstrat că microARN-205-5p (miR-205-5p) inhibă invazia celulelor canceroase de colon prin țintirea ZEB1 și inducerea indirectă a expresiei E-caderinei (moleculă de adeziune), atât la nivel transcripțional, cât și la nivel translațional. MicroARN-urile (miARN-urile) sunt secvențe scurte de ARN, compuse din 20-22 de nucleotide, ce nu codifică proteine, dar joacă un rol important în reglarea unui număr

semnificativ de procese celulare. MiARN-urile se leagă de ARN-ul mesager (ARNm) complementar și inhibă traducerea acestuia în proteine funcționale.

miARN-205-5p a fost de asemenea testat preliminar acestui proiect în contextul limitării invaziei melanomului. Specific, analiza TCGA a demonstrat că expresia miR-205-5p este semnificativ scăzută în probe tumorale primare de melanom (comparativ cu tesut normal), iar expresia scade drastic în cazul probelor metastatice. Expresia ZEB1, o țintă directa a miR-205-5p, este crescută în probele metastatice comparativ cu cele primare, iar CDH1 (E-cadherina), o țintă directă a ZEB1 si principala proteină implicată în procesul de invazie, este opus exprimată . Pentru a testa efectele terapeutice ale miR-205-5p in melanomul malign, am tratat doua linii celulare de melanom cu miR-205-5p mimic (rol terapeutic) și inhibitor miR-205-5p (rol opus). Analiza RT-qPCR după tratament arată că nivelul miR-205-5p a crescut în ambele linii celulare comparativ cu celulele control martor. Capacitatea miR-205-5p mimic de a încetini migrarea și invazia celulelor a fost demonstrată prin teste funcționale de tip *scratch assay* și *transwell*. Astfel, datele preliminare arată că **miR-205-5p deține un rol funcțional în celulele de melanom malign, în special în cele mai agresive, rol corelat cu inhibarea procesului de migrare, invazie și metastază.**

Prezentul proiect are ca și obiective principale analiza detaliată la nivel transcriptomic si la nivel proteomic a efectelor tratamentului cu miR-205-5p în vederea identificării profilului molecular asociat cu suprimarea metastatică și principalelor gene/proteine implicate în acest proces. Mai mult, se urmărește de asemenea identificarea unui model de cultură in vitro a celulelor de melanom care să poată mima cât mai eficient condițiile întâlnite în organismul uman.

Rezumatul rezultatelor proiectului

Expresia miARN-205 scade semnificativ în probele de țesut metastatic provenit de la pacienți diagnosticați cu melanom malign comparativ cu probele de țesut primar de la apcienți cu aceeași malignitate. Acestă analiză demonstrează implicarea profunda a mi-ARN-205 în procesul de metastazare și diseminare susținută (Tabel 1).

Tabel 1. miARN cele mai supraexprimate în țesutul primar de melanom versus țesutul metastatic

No	miRNAs	FC	pvalue	Log2FC
1	hsa-mir-205	25.54670102	5.48E-05	4.675065
2	hsa-mir-203	19.36715226	5.71E-07	4.27554
3	hsa-mir-944	9.787864991	0.000281	3.290994
4	hsa-mir-200c	7.740118373	2.27E-05	2.952356
5	hsa-mir-141	5.797831359	9.94E-06	2.535513
6	hsa-mir-200a	5.117724936	0.000248	2.355503
7	hsa-mir-429	3.278166402	3.39E-05	1.712889
8	hsa-mir-224	2.808892511	7.81E-05	1.490001

Pentru o mai bună vizualizare a datelor selectate s-a ales ilustrarea cu volcano plot ce curinde valorile logaritmate de FC (log2) și pvalue (log10) (Figura 1). Acesta permite identificarea vizuală rapidă a miARN cu modificări mari ale FC, care sunt, de asemenea, semnificative statistic.

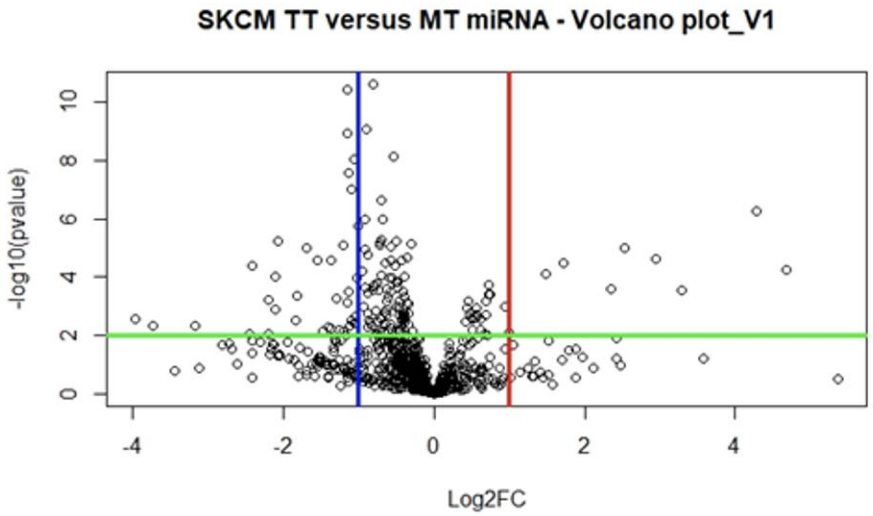

Figura 1. Volcano plot expresie miARN in melanomul malign - linia roșie reprezintă FC>2, linia albastră reprezintă FC < -2, iar linia verde reprezintă pval < 0.01

În vederea analizei profilul molecular al celulelor de melanom malign ca răspuns la terapia cu miR-205 celulele de melanom au fost transfectate cu mir-205-5p mimic, iar eficiența transfecției a fost validată prin RT-PCR (Figura 2).

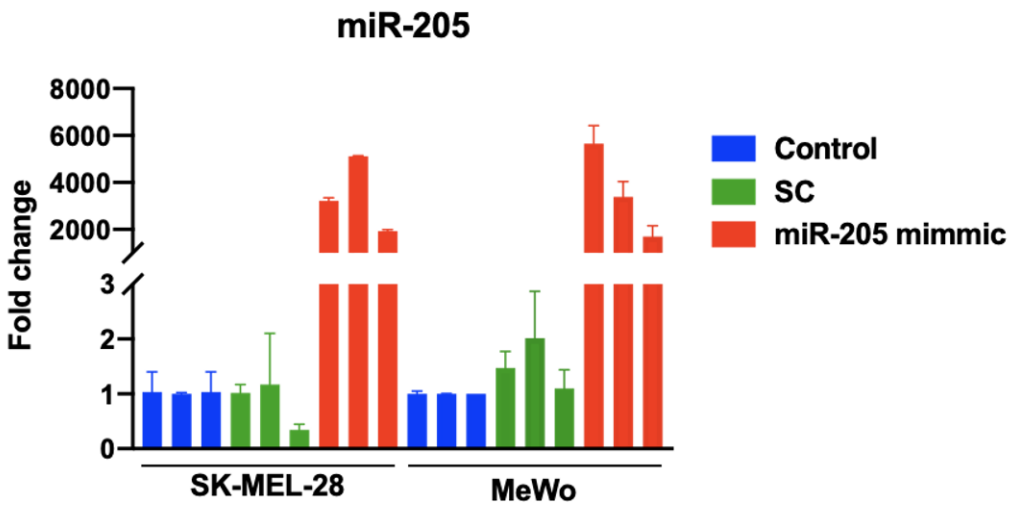

Figura 2. Expresia miR-205-5p în celulele de melanom malign tratate cu agent de transfecție (Control), agent de transfecție și secvență scramble (SC) și agent de transfecție și secvență miR-205-5p mimic (miR-205 mimic)

Celulele au fost tratate cu agent de transfecție (Control), agent de transfecție și secvență scramble (SC) și agent de transfecție și secvență miR-205-5p mimic (miR-205 mimic). După cum se poate observa în Figura 2, nivelul miR-205 espre scăzut în cazul liniilor control si scramble și crește de până la 6000X FC în cazul liniilor tratate cu secvență mimic.

Mai departe, linia celulară SK-MEL-28 a fost analizată pentru profilul proteic complet. Probele analizate au constat din pelet celular obtinut din linia de melanom SK-MEL-28 tratată in prealabil cu SCRM si Mimic (tabel I); Au fost incluse 3 replicate biologice si 2 replicate tehnice.

Numar total peptide identificate: 20863 ce corespund la un numar de 1822 proteine. Dintre acestea au fost eliminate proteinele fals identificate (153) (Figura 3).

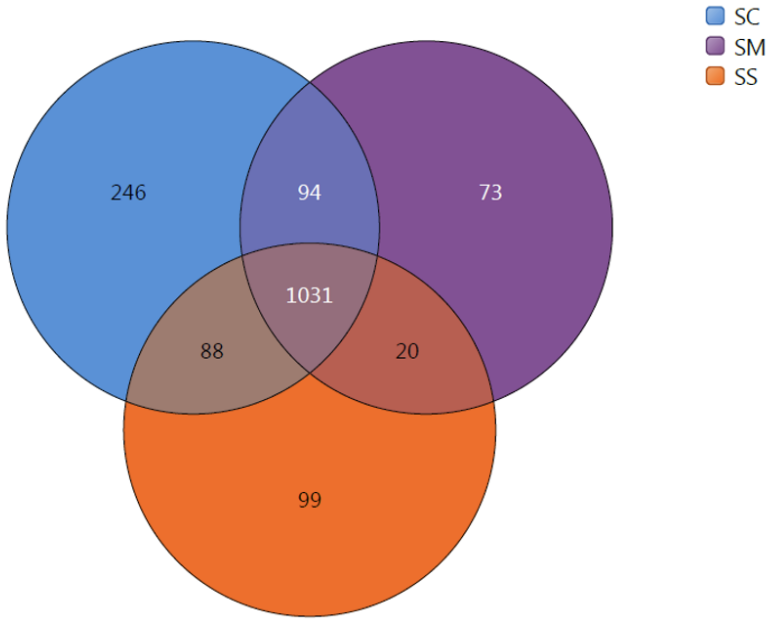

Figura 3. Diagrama Venn a distribuției proteinelor per grup. Legenda: SC – SKMEL control; SM – SKMEL Mimic; SS -SKMEL Scramble

Analiza amănunțită a modificărilor la nivelul întregului proteom demonstrează implicarea profundă a mir-205-5p într-o serie heterogenă de procese celulare prin modificarea a sute de proteine ca țintă directă sau indirectă. Prezentul studiu subliniază importanța miR-205-5p în procesul de metastazare, fiind ilustrate ca top căi de semnalizare modificate – **Apical junction** (conform MSigDB Hallmark 2020, analiză realizată în funcție de clasificarea ordonată dată de valoarea p), SRP-dependent cotranslational **protein targeting to membrane** Homo sapiens (conform Reactome 2016) și **Anchoring fibril formation** (conform Reactome 2016) (Figura 4).

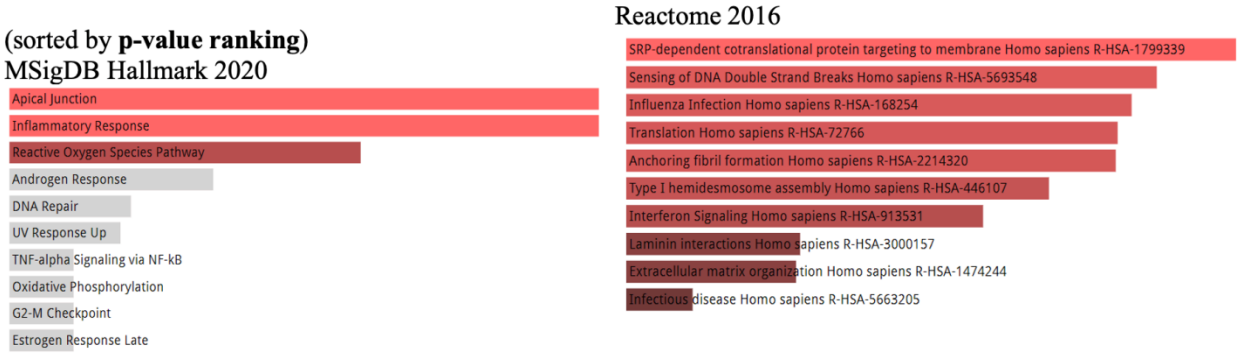

Figura 4. Căile de semnalizare identificate ca fiind implicate în melanomul malign în urma transfecției cu miR-205-5p mimic pe baza analizei proteomului modificat (proteine semnificativ diferite intre grupurile SKMEL_Scramble si SKMEL_Mimic)

Impactul rezultatelor obţinute

Prezentul proiect propune o abordare nouă în managementul melanomului malign ce nu se concentrează pe inducerea morții celulare, ci mai degrabă pe oprirea procesului de metastazare și prelungirea perioadei de supraviețuire. În cazul melanomului malign, unul din cele mai agresive cancere în ceea ce privește evoluția metastatică, această abordare ar putea prezenta reale beneficii pentru pacienți prin creșterea timpului de supraviețuire, dar și a eficienței terapiilor curente prin abordări terapeutice combinate (miR-205-5p și terapii curente aprobate).

Cel mai semnificativ rezultat este reprezentat de profilul proteic complet ca urmare a terapiei de înlocuire cu miR-205-5p în melanomul malign. Din cunoștințele noastre, acesta este prima prezentare a întregului proteom țintă a mir-205-5p ce descrie în detaliu lista de proteine implicate în modularea procesului de metastazare prin intermediul acestui microARN, dar și în alte procese precum răspunsul inflamator, repararea ADN și semnalizarea TNF-alpha.