

## **RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC**

Etapa 2/2013

### **Rezumat**

Conform Planului de realizarea al proiectului, pentru etapa 1/2013. proiectul a avut urmatoarele obiective:

- Conceperea de sonde specifice pentru structuri de tip array pentru cancerul de colon;
- Design al materialelor suport si al structurilor de tip array; fabricarea de prototipuri pentru cancerul de colon. Monitorizarea parametrilor tehnici si fizico-chimici si realizarea de teste preliminare;
- Design al materialelor suport si al structurilor de tip array pentru cancerul de san;
- Diseminarea rezultatelor: publicarea rezultatelor în reviste nationale si internationale si prezentarea de comunicari stiintifice;
- Workshop intermediar de analiza critica a proiectului;
- Pregatirea si prezentarea raportului de faza.

Obiectivele mentionate au fost realizate; astfel:

- au fost actualizate datele referitoare la factorii genetici si la modificarile produse asupra acestora (mutatii, etc), in special cele referitoare la gena Kras, specifice cancerului colorectal (CRC); pe baza acestor date si ale studiilor anterioare realizate (raport de faza 2102) au fost identificate secvente oligonucleotidice care sa fie sintetizate si utilizate pentru obtinerea de structuri de tip array (sonde) care sa permita, prin hibridare, detectia mutatiilor . Pentru asigurarea unui grad ridicat de specificitate ridicata, s-au ales secvente de 40 meri, specifice pentru codonii 12 si 13 din exonul 2 al genei, codoni cu frecventa maxima de mutatii si consecinte asupra evolutiei si raspunsului la tratament in CRC. S-a urmarit ca la capete sa fie prezente grupari  $-NH_2$  care sa permita o buna legare atat de materialul suport, cat si de cromofor.
- pe baza selectiei mentionate, au fost realizate structuri de tip array si au fost realizate studii de identificare a prezentei de mutatii, prin secventiere automata. Referatul *in extenso* prezinta detalii referitoare la metodologia de fabricare a prototipurilor de tip array, realizate pe lame de sticla functionalizate cu aldehida, la optimizarea procedurilor, prin varierea conditiile de lucru (concentratii sonde, temperatura, a detectiei de semnal etc), in final obtinandu-se structuri array care asigura o buna atasarea a probelor si o buna detectie a hibrizilor formati. In cursul anului a fost pusa la punct si optimizata metodologia de secventiere directa; prin aceasta tehnica au fost analizate 54 de probe provenite de la pacienti cu CRC, internati si tratati in Institutul Oncologic Bucuresti. Au fost decelate mai multe mutatii de tip punctiform (tranzitii/transversii); pentru certitudine secventierea a fost realizata atat pe catena directa ("sens"), cat si pe cea complementara ("antisens").
- desi datele de literatura mentioneaza genele BRCA 1 si 2 ca fiind printre cei mai importanti factori genetici implicati in aparitia cancerului mamar, dar si a altor forme de cancer, mutatiile prezente (care modifica/suprima functia de protectie a genelor) putand fi transmise ereditar, marind astfel si mai mult semnificatia acestor gene. Modificari similare sunt mentionate si genele BRCA la animale, in particular, la caine. Paradoxal insa, comparativ cu omul, datorita consanguinizarii, practicata pentru asigurarea puritatii diferitelor rase de caine, heterogenicitatea/variabilitatea genetica este mai redusa la caine si, in consecinta probabilitatea de depistare de modificari genetice, inclusiv in ceea ce priveste genele BRCA este crescuta, studiile de profil nu sunt foarte

numeroase, in parte datorita si costurilor foarte ridicate ale acestora. Pe de alta parte insa, atat omul, cat si animalul de companie ("pet), cainele, mai ales, sunt supusi acelorasi factori de risc oncogen/mutagen. Ca urmare, tinand cont si de raspunsul si de evolutia mai rapide la nivel de animal, acesta se constituie ca o adevarata "sentinela" in identificarea riscului oncogen si, in consecinta, de identificare a unor metode de preventie pentru om, motiv pentru care proiectul abordeaza studiul BRCA atat la om, cat si la caine, problema importanta pentru Romania, in care studiile la om sunt extrem de sporadice, iar la animal – absente. Pornind de la structura genetica au fost stabilite secvente specifice pentru cele mai frecvente mutatii genetice BRCA cunoscute: 185delAG si 5382insC în BRCA1 si respectiv, 6174delT, in BRCA2, secvente care sa fie utilizate ca sonde pentru structuri de tip array si respectiv, sa fie investigate alternativ prin metodele experimentale mentionate (secventiere, RT-PCR, rezolutie inalta, etc):

- au fost prezentate mai multe comunicari stiintifice in cadrul unor manifestarii stiintifice dintre care 2 - nationale cu participare internationala si 2 manifestari, in strainatate; de asemenea, este in curs de finalizare un articol;
- pentru a se realiza o verificare interna a modului de realizare a proiectului, precum si pentru identificarea unor aspecte ce se cer imbunatatite sau modificate, cei trei parteneri din proiect (IOB, IMT si IMC) au organizat un workshop; in cadrul acestuia, fiecare dintre parteneri si-a prezentat rezultatele obtinute si au facut propuneri pentru etapa urmatoare (2014) a proiectului; s-a apreciat ca s-au indeplinit sarcinile contractuale pentru etapa 2013 a proiectului si ca, in cusul anului s-a raspuns la timp tuturor solicitarilor venite din partea Autoritatii Contractante – UEFISCDI;
- conform acordului exprimat de toti partenerii si cu contributia efectiva a acestora, tinandu-se cont de indeplinirea prevederilor contractuale, atat pe plan stiintific, cat si financiar a fost elaborat prezentul raport de faza, care este inaintat spre evaluare si aprobare Autoritatii Contractante.