



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00261

(22) Data de depozit: 03.04.2014

(41) Data publicării cererii:
30.09.2015 BOPI nr. 9/2015

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE- DEZVOLTARE ÎN
DOMENIUL PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE "VICTOR BABEȘ",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• CODRICI ELENA,
STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII NR. 4,
BL. PM 51, SC. 3, ET. 7, AP. 117,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• TĂNASE CRISTIANA,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.126, BL.P 34,
SC.1, AP.30, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B,
RO;
• ALBULESCU RADU NICOLAE AUREL,
STR. ROȘIA MONTANĂ NR. 6, BL. 07,
SC.C, ET. 2, AP. 125, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• STĂNCULESCU RUXANDRA,
ALEEA ALEXANDRU NR. 9A, ET. 8, AP. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• POPESCU IONELA DANIELA,
STR. SFÂNTUL ELEFTERIE NR. 25,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• MIHAI SIMONA, BD. CAMIL RESSU
NR. 76, BL. S1B-S1C, SC. B, AP. 34,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• NEAGU ANA-IULIA, CALEA DOBROGEI
NR. 199, VALU LUI TRAIAN, CT, RO;
• NECULA LAURA GEORGIANA,
ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D,
ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• MAMBET CRISTINA,
STR. DR.IACOB FELIX NR. 95, BL. 17,
SC. A, ET. 6, AP. 25, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) SET DE BIOMARKERI PENTRU DIAGNOSTICUL ȘI
PROGNOSTICUL CANCERULUI DE COL UTERIN REALIZAT
PRIN STUDIUL PROFILULUI PROTEOMIC

(57) Rezumat:

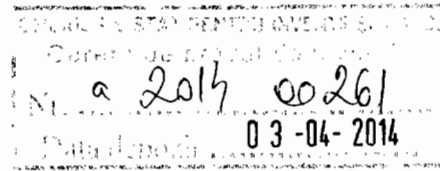
Invenția se referă la o metodă de identificare a unui set de biomarkeri utili în diagnosticul și prognosticul cancerului de col uterin. Metoda conform invenției constă în analiza profilului proteomic dintr-un țesut tumoral-patologic față de un țesut peritumoral-normal, din care s-a identificat un set de biomarkeri proteici care au variat în greutatea moleculară în domeniul 15...50 kDa cu pl de 5,5...7,5, și anume: CDK4 cu greutatea

moleculară 33 kDa și pl 6,66, ciclina B1 cu greutatea moleculară 48 kDa și pl 7,1, p16^{INK4a} cu greutatea moleculară 16 kDa și pl 5,5, utilizat ca instrument de prognostic și diagnostic molecular pentru cancer de col uterin.

Revendicări: 2
Figuri: 8

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la identificarea unui set de biomarkeri utili în diagnosticul și prognosticul cancerului de col uterin, utilizând tehnologii proteomice de ultimă generație.

Modificările prezente la nivelul expresiei, structurii sau funcției proteinelor reprezintă un indicator util în patologia tumorală și prin urmare aceste proteine modificate pot constitui biomarkeri utili în diagnostic, precum și în evaluarea prognosticului sau terapiei. Mecanismele care stau la baza apariției cancerului de col uterin sunt complexe, implicând participarea mai multor proteine supra- sau sub-exprimate. În acest context, încercarea de detectare a unor seturi de biomarkeri cu sensibilitate și specificitate crescută poate avea o rată de succes mai mare în diagnostic, prognostic și terapie în comparație cu identificarea unui biomarker unic [1].

Cancerul de col uterin reprezintă a doua cauză de deces prin cancer la femei la nivel mondial, cât și la nivel național, astfel dezvoltarea de noi strategii de diagnostic, prognostic, precum și de tratament necesită o preocupare intensă [2]. Screening-ul realizat cu testul Papanicolau, cât și testarea și vaccinarea HPV (human papilloma virus) au condus la scăderea incidenței și mortalității datorate cancerului de col uterin; cu toate acestea, cancerul de col uterin rămâne o cauză majoră de deces în populația feminină [3]. Evenimentul declanșator al cancerului de col uterin invaziv este reprezentat de infecția cu diferite tipuri de HPV. Interesant este faptul că expresia oncogenei virale este necesară, dar nu suficientă pentru a declanșa cancerul de col uterin, fiind implicați o multitudine de alți factori pentru progresia tumorală [4]. Astfel, sunt depuse eforturi majore în cercetarea biomedicală pentru identificarea de noi factori co-cancerigeni și pentru înțelegerea mecanismelor celulare și moleculare implicate în dezvoltarea cancerului de col uterin. Pentru atingerea acestui obiectiv, strategiile de analiză proteomică constituie instrumente puternice pentru descifrarea mecanismelor complexe care stau la baza interacțiunii dintre infecția virală și modificarea expresiei diferitelor proteine implicate în rezistența la apariția apoptozei, creșterea și diferențierea celulară tumorală, care împreună conduc la apariția cancerului de col uterin [4].

La ora actuală se depun eforturi considerabile pentru a descoperi noi medicamente și pentru a dezvolta terapii în vederea tratării cancerului de col uterin [5]. Astfel,

cercetările realizate în ultimii ani cu scopul de a identifica noi seturi de biomarkeri pentru diagnostic, prognostic și terapie la nivelul cancerului de col uterin reprezintă un deziderat major în lumea științifică atât la nivel internațional cât și național.

Proteomica are un rol important în identificarea rapidă de noi proteine țintă și de asemenea ajută la elucidarea evenimentelor moleculare care stau la baza dezvoltării și progresiei tumorale. Prin compararea profilului expresiei proteinelor între țesutul tumoral provenit de la pacienți cu cancer de col uterin și control pot fi identificați noi biomarkeri proteici implicați în cancerul de col uterin [6,7].

În cancerul de col uterin au fost identificate numeroase modificări la nivelul ciclului celular, ca urmare a infecției cu HPV. Aceste modificări includ supraexprimarea diferitelor ciclone și inhibitori CDK [8]. Aceste modificări au fost investigate pentru potențiala utilitate în diagnosticul clinic al cancerului de col uterin. Până în prezent, niciunul dintre acești markeri, supraexprimați în neoplazia HPV-indusă, nu manifestă sensibilitate sau specificitate suficientă pentru detectarea precisă a cancerului de col uterin (fie pentru leziunile CIN2+ în histologie, fie celule pozitive HSIL în citologie) putând fi astfel utilizați ca markeri moleculari independenți într-un test de diagnostic clinic [9].

Procesul de diagnostic este dificil, în mare măsură datorită heterogenității tumorilor cervicale, cât și limitării tehnicilor de histologie; astfel, este dificil de anticipat răspunsul individual la terapie în funcție de diagnosticul histologic. În acest scop s-a încercat identificarea unor biomarkeri proteici cu capacitate de anticipare a evoluției tumorilor cervicale, în vederea dezvoltării și utilizării lor în terapii țintite.

Identificarea de noi biomarkeri și stabilirea profilului proteic în cancer poate oferi o contribuție semnificativă în vederea optimizării diagnosticului, prognosticului, a deciziei terapeutice și a evaluării răspunsului la tratament. În vederea realizării acestui deziderat este importantă realizarea studiului proteomic al tumorilor cervicale, respectiv analiza proteomului la nivelul biopsiilor.

Identificarea de noi biomarkeri în diferite tipuri de tumori cu ajutorul aplicațiilor proteomice utilizate și în prezentul brevet, constituie subiectul unor cercetări la nivel internațional, aceste studii fiind publicate în literatura de specialitate.

Pe site-ul *European Patent Office* sunt prezentate câteva brevete ce implică utilizarea tehnologiei 2D-DIGE în evidențierea unor seturi de biomarkeri în cancer.

Brevetul US2011097738 [10] prezintă o metodă proteomică de screening pentru a diagnostica hepatocarcinomul celular HCC într-un stadiu incipient. În acest brevet, prin utilizarea tehnologiei 2D-DIGE, a fost definită carboxilesteraza I (hCEI) din plasma umană ca biomarker pentru HCC, nivelul secreției acestei proteine fiind mai mare la pacienții cu HCC decât la voluntarii sănătoși. Brevetul CN102053159 [11] descrie un grup de proteine cu expresie diferențială în țesutul pancreatic provenit dintr-un model de cancer pancreatic timpuriu, proteinele identificate prin 2D-DIGE având o specificitate crescută, aceste proteinele putând fi utilizate ca biomarkeri pentru diagnosticarea precoce a cancerului pancreatic, oferind astfel o metodă eficientă pentru diagnosticul clinic precoce al cancerului pancreatic. Abordări similare sunt descrise și în brevetul JP2007215412 [12].

Până în prezent nu sunt menționate în literatura de specialitate, atât la nivel național, cât și internațional, brevete care să facă referire la utilizarea unui set/combinatie de biomarkeri cu rol în evaluarea agresivității tumorilor de col uterin. Echipa noastră de cercetare a menționat în mai multe publicații internaționale și naționale necesitatea obținerii unui panel de biomarkeri, care să confere o putere de decizie ridicată față de biomarkerii individuali în diagnosticul precoce, adecvarea terapiei și monitorizarea evoluției cancerului [13,14].

Aceste argumente au constituit motive pentru aprofundarea studiului proteomic asupra cancerului de col uterin, folosind tehnologii proteomice de ultimă generație, cu scopul final de identificare a unor biomarkeri cuantificabili în mod obiectiv și care sunt orientativi pentru un anumit status patologic. Odată cu identificarea caracteristicilor discriminatorii - caracterizate și validate, aceste molecule pot reprezenta biomarkeri, care pot fi folosiți prospectiv, pentru a diferenția loturile incluse în studiu.

Problemele pe care își propune să le rezolve prezenta invenție constau în:

- identificarea unui set de biomarkeri neabordați încă în practica medicală curentă, a căror variație de expresie constituie un indicator pentru modificările patologice de la nivelul colului uterin.

- identificarea unor biomarkeri prin analiza profilului proteic în cancerul de col uterin prin tehnologii proteomice de ultimă generație.

- realizarea unui algoritm de clasificare bazat pe combinația de tipare de semnături moleculare (set de biomarkeri); acest algoritm de clasificare este aplicabil

pentru completarea diagnosticului și evaluarea prognosticului în cazul cancerului de col uterin.

Detalii privind realizarea prezentei invenții sunt prezentate în exemplele următoare.

Descrierea figurilor

Figura 1. Prezintă un exemplu de geluri 2D-DIGE obținute din țesut tumoral (A) și peritumoral (B).

Figura 2. Prezintă proteina identificată la greutatea moleculară de 48 kDa și pI 7,1.

Figura 3. Prezintă proteina identificată la greutatea moleculară de 16 kDa și pI 5,5.

Figura 4. Prezintă proteina identificată la greutatea moleculară de 33 kDa și pI 6,55.

Figura 5. Prezintă supraexpresia proteinei CDK4 într-un carcinom cervical, cu infecție HPV versus țesut peritumoral.

Figura 6. Prezintă supraexpresia ciclonei B1 într-un carcinom cervical, cu infecție HPV versus țesut peritumoral.

Figura 7. Prezintă supraexpresia proteinei p16^{INK4a} într-un carcinom cervical, cu infecție HPV versus țesut peritumoral.

Figura 8. Prezintă nivelul seric al markerului tumoral CA125 la cazurile la care a fost identificat setul de biomarkeri.

EXEMPLUL 1 – Prepararea probelor în vederea analizei prin metoda 2D-DIGE.

Au fost colectate probe de țesut tumoral și peritumoral (margine de rezecție liberă de tumoră - considerat control) de la 8 paciente cu carcinom de col uterin, cu infecție HPV, cu vârsta medie de 46,61 ani (interval 41-55 ani), operate în Spitalul Clinic de Urgență „Sfântul Pantelimon”, Clinica de Obstetrică Ginecologie. Fragmente de țesut au fost prelevate intraoperator, repartizate în tampoane specifice prelucrării ulterioare și păstrate la -80°C până la determinare. Probele au fost prelucrate având semnat acordul informat al pacientelor.

Pre-rehidratarea stripurilor

Această etapă s-a realizat cu soluție de rehidratare care conține amfoliții corespunzători IPG stripului cu care s-a lucrat, respectiv 3-11 și soluție DeStreak. Rolul acestei etape a fost de a transforma grupările tiol în bisulfide stabile și de a proteja grupările bisulfidice de oxidarea nespecifică. Peste soluția de rehidratare a fost plasat stripul, iar peste acesta ulei mineral. Pre-rehidratarea s-a făcut cu 10-20 ore înainte de încărcarea probelor în stripuri.

Liza tisulară

S-a realizat triturarea a 300 mg țesut tumoral și peritumoral pe gheață și spălarea de 3-5 ori cu tampon fosfat salin (TFS). După îndepărtarea TFS, fragmentele de țesut au fost omogenizate la 4°C cu tampon de liză (uree 7M; tiouree 2M; CHAPS 2%; DTT 1%; EDTA 0,5mM, inhibitori de proteaze 1%); raportul țesut:tampon liză a fost de 1:2 (w:v). S-au centrifugat probele la 18.000 rpm, timp de 10 minute la 4°C , s-a preluat supernatantul urmând a se determina concentrația de proteine din probă.

Determinarea concentrației de proteine

S-a realizat în vederea încărcării unei cantități corecte de proteine, corespunzătoare cu lungimea stripului ales în experiment cât și cu tipul colorației, în final dorindu-se obținerea unor rezultate comparabile. Aceasta etapa a fost realizată cu 2D Quant kit (GE Healthcare), dar poate fi realizată și cu alte kituri compatibile cu substanțele folosite în tamponul de liză.

1. S-a pregătit curba standard utilizând Albumină Serică Bovină (BSA) - diluții seriale de soluție standard de la 50 μg/μL pâna la 0 μg/μL. Volumul final a fost de 30 μL/probă. Curba și probele s-au lucrat în duplicat.
2. S-a adăugat 500 μL precipitant / tub (standard și probe); vortexare scurtă și incubare 2-3 minute la temperatura camerei.
3. S-a adăugat 500 μL co-precipitant / tub; vortexare scurtă și centrifugare la 10 000 × g pentru 5 minute. Sedimentul a fost vizibil și s-a îndepărtat supernatantul. S-au re-centrifugat scurt probele și s-a îndepărtat supernatantul rămas.
4. S-a adăugat 100 μL de reactiv cupric și 400 μL de apă ultrapură/tub. Vortexare scurtă.
5. S-a adăugat 1 mL de reactiv de culoare de lucru / tub (100 părți de reactiv de culoare A cu 1 parte reactiv de culoare B). Vortexare imediată.
6. Incubare 15-20 minute la temperatura camerei și citirea absorbanței la 480 nm utilizând apă ultrapură ca referință, imediat după adăugarea reactivului de culoare de lucru. S-a utilizat curba standard pentru determinarea concentrației de proteine din probe.

Îndepărtarea substanțelor de interferență din probe s-a realizat în vederea pregătirii probelor pentru electroforeza 2D-DIGE, altfel rezultatele obținute ar putea fi neconcludente din cauza conductivității mari sau a concentrației scăzute de proteine. Procedura acționează prin precipitarea cantitativă a proteinelor, lăsând în soluție substanțele de interferență - detergenți, săruri, lipide, acizi nucleici și fenolici. Ulterior proteinele au fost resuspendate într-o soluție compatibilă cu focalizarea izoelectrică din prima dimensiune. Această etapă a fost realizată cu Clean-up kit (GE Healthcare), dar poate fi realizată și cu alte kituri disponibile comercial.

Soluția tampon de spălare s-a păstrat la -20°C peste noapte înainte de utilizare. Toate etapele s-au realizat cu probele pe gheață.

1. S-a transferat o cantitate de 1-100 μL lizat tisular (conținând 50 μg proteină/probă) în tuburi de 1,5 mL.
2. S-a adăugat 300 μL precipitant peste probe și s-au vortexat. Incubare 15 minute pe gheață.
3. S-a adăugat 300 μL co-precipitant peste probe și s-au vortexat.

4. S-au centrifugat probele la 12.000 g pentru 5 minute; este vizibil sedimentul de proteine. S-a aruncat supernatantul fără a disturba sedimentul.
5. S-a adăugat 40 μ L de co-precipitant peste sediment. Incubarea probelor 5 minute pe gheață.
6. S-au centrifugat probele la 12.000 g pentru 5-10 minute; îndepărtarea supernatantului.
7. S-a adăugat 25 μ L de apă ultrapură și s-au vortexat probele 5-10 secunde. Sedimentul este dispersat, dar nu dizolvat.
8. S-a adăugat 1 mL de soluție tampon de spălare (răcit în prealabil) și 5 μ L aditiv de spălare. S-au vortexat probele până când sedimentul este complet dispersat.
9. S-au incubat probele la -20°C pentru 40 de minute. În acest interval de timp s-au vortexat probele pentru 20-30 de secunde o dată la fiecare 10 minute.
10. S-au centrifugat tuburile la 12.000 g pentru 5 minute.
11. S-a preluat supernatantu, iar sedimentul a fost lăsat 5 minute la aer.
12. S-a resuspendat sedimentul într-un volum corespunzător de tampon de lucru/soluție compatibilă cu IEF.

EXEMPLUL 2 -- marcarea probelor/controlului intern

Toate probele se prepară conform exemplului 1.

Controlul și ajustarea pH-ului

S-a ajustat pH-ul probelor la 8,5 și s-a realizat marcarea acestora cu fluorocromi.

Marcarea cu CyDye a probelor și a standardului intern

Reconstituirea CyDye

1. S-a adăugat 5 μ L dimetilformamidă (DMF) în fiecare fiolă de CyDye.
2. S-a realizat centrifugarea și apoi vortexarea viguroasă a fiolelor pentru 30 secunde.
3. S-au centrifugat fiolele cu CyDye timp de 30 secunde la 12000g.

Marcarea probelor:

1. S-a adăugat un volum de probă corespunzător pentru 50 μ g proteină într-un tub.
2. S-a adăugat 1 μ L de CyDye diluat (400 pmol) în tubul cu probă.

3. S-a realizat centrifugarea scurtă, iar tuburile au fost lăsate pe gheață pentru 30 de minute, la întuneric.
4. S-a adăugat 1 μL de lizină 10 mmol/L pentru stoparea reacției. S-a realizat centrifugarea scurtă și s-au lăsat 10 minute pe gheață, la întuneric.

Notă: *Probele sunt marcate cu Cy3 și Cy5.*

Marcarea standardului intern:

n - numărul de geluri din experiment

1. S-a adăugat un volum de standard intern echivalent cu $n \times 50 \mu\text{g}$ proteină într-un tub.
2. S-au adăugat *n* μL de Cy2 în tubul cu standardul intern.
3. S-a realizat centrifugarea scurtă, iar tuburile au fost lăsate pe gheață pentru 30 de minute, la întuneric.
4. S-a adăugat *n* μL de lizină 10 mmol/L pentru stoparea reacției. S-a realizat centrifugarea scurtă și s-au lăsat 10 minute pe gheață la întuneric.

Probele sunt aplicate direct pe gelul stripului rehidratat (3-11NL), prin sistemul de cup-loading, în tăvița de izoelectrofocalizare.

Se aplică ulei mineral pe strip și peste probe.

EXEMPLUL 3 – Focalizarea izoelectrică

Focalizarea izoelectrică (IEF) - într-un gradient de pH, sub influența unui câmp electric, o proteină se va deplasa în gradient până la locul unde încărcătura sa electrică va fi zero.

După așezarea stripurilor în tăvița de izoelectrofocalizare, aceasta se introduce în celula Protean IEF (Bio-Rad), se conectează la electrozi și se programează conform protocolului de lucru optimizat. Astfel, după aplicarea probelor, voltajul este crescut în mod gradual până la valoarea necesară pentru focalizare și este păstrat la acest nivel timp de câteva ore. Un voltaj inițial scăzut minimizează agregarea proteinelor din probă.

Programul de IEF: timp de rehidratare 1 ora, temperatura 20°C, curentul per strip 75 μA , lungimea stripului 18 cm, gradientul de pH al stripului 3-11 NL, etapa 1 - step & hold la 150 V timp de 3 ore, etapa 2 - step & hold la 300 V timp de 3 ore, etapa 3 - gradient la 1000 V timp de 6 ore, etapa 4 gradient - la 10000 V timp de 1 ore. Etapa 5 step & hold la 10.000 V timp de 2 ore, etapa 6 - la 300V timp de 3 ore.

EXEMPLUL 4 - separarea proteinelor în a 2-a dimensiune într-un gel de poliacrilamidă, în funcție de greutatea moleculară.

Migrarea proteinelor în a 2-a dimensiune s-a realizat pe geluri de poliacrilamidă de 12% care au fost lăsate peste noapte la polimerizat.

Tamponul de electroforeză folosit - Tris/Glicină/SDS 1X. Stripurile 3-11NI de 18 cm au fost incubate 20 minute cu 5 mL tampon de echilibrare I și 5 mL tampon de echilibrare II, pe agitator.

Tamponul de echilibrare I are rolul de a reduce grupările sulfhidril și s-a preparat astfel: 6 M Uree, 2% SDS, 0,375 M Tris/HCl, pH8,8, 20% glicerol, 2% (w/v) DTT și soluție glicerol 30% până la completarea volumului final.

Tamponul de echilibrare II are rolul de a alchila grupările sulfhidril și s-a preparat astfel: 6 M Uree, 2% SDS, 0,375 M Tris/HCl, pH8,8, 20% glicerol, 0,5 g iodoacetamidă și soluție glicerol 30% până la completarea volumului final.

După echilibrare s-a realizat plasarea stripurilor pe geluri. Peste gelul de poliacrilamidă se toarnă gel de agaroză în care se introduce stripul fără a se forma bule de aer. Pentru vizualizarea migrării corecte s-a încărcat un marker de greutate moleculară/gel.

Electroforeza propriu-zisă s-a realizat la 7mA per gel timp de 1 oră și apoi la 25 mA per gel peste noapte cu sistemul Protean II xi Cell (BioRad).

EXEMPLUL 5 – analiza imaginilor și identificarea biomarkerilor

Gelurile au fost scanate la 3 lungimi de undă diferite, respectiv 488nm (Cy2), 532nm (Cy3) și 633nm (Cy5) cu ajutorul scanner-ului Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare). Imaginile obținute au fost analizate și prelucrate cu softurile ImageMaster 2D Platinum Software (GE Healthcare) și PDQuest (BioRad). Pentru calibrarea sistemelor în vederea stabilirii greutății moleculare a fost utilizat standardul 2D SDS-PAGE (BioRad).

Au fost identificate peste 1500 de spoturi/proteine în ambele tipuri de țesut analizate (tumoral și peritumoral/control). După prelucrarea și editarea imaginilor, au fost detectate ~1359 spoturi în probele de țesut tumoral și ~1297 spoturi în țesutul control. Spoturile s-au încadrat în ambele cazuri într-un interval de mărime de 10-90 kDa și un

interval de pH de 4,5-8,5. Au fost selectate ca spoturi semnificative acele spoturile care au prezentat la nivelul țesutului tumoral o expresie unică și o creștere de trei ori sau chiar mai mare în volumul normalizat față de imaginile din control ($p < 0.01$). Ca rezultat al unei analize comparative între spoturile provenite din țesut tumoral versus control s-a constatat ca aproximativ 109 de proteine au fost exprimate diferențiat/supra-exprimate în țesutul tumoral. Dintre acestea au fost identificate 15 proteine care au fost supra-exprimate de mai mult de trei ori (ca densitatea) în țesutul tumoral în comparație cu controlul. Aceste proteine au fost determinate ca proteine ce au variat în greutate moleculară între 15-50 kDa cu pH de 5,5-7,5. Acest profil proteic de expresie a fost reproductibil pentru fiecare probă în parte.

Din compararea cu bazele de date (World 2D-PAGE repository), au putut fi identificate ca posibili candidați, pe baza valorilor pI și a greutății moleculare următoarele proteine:

- CDK4 cu greutatea moleculară de 33 kDa și pI 6,55;
- ciclina B1 cu greutatea moleculară de 48 kDa și pI 7,1;
- inhibitorul kinazei 2A ciclin-dependentă ($p16^{\text{INK4a}}$) cu greutatea moleculară de 16 kDa și pI 5,5.

Rezultatele analizei proteomice prin 2D-DIGE sunt redată în figurile 1-4.

EXEMPLUL 6 - validarea prin Western blot a proteinelor identificate

S-a realizat verificarea diferențelor între expresia biomarkerilor proteici - CDK4, ciclina B1 și $p16^{\text{INK4a}}$ la nivelul țesutului tumoral și peritumoral provenit de la pacienți cu cancer de col uterin, prin analiza Western blot.

Într-un gel SDS-PAGE 12% s-a încărcat o cantitate de 25 μg proteină/probă. Înainte de încărcare s-a realizat fierberea proteinelor din proba cu DTT în vederea ruperii punților disulfidice. Ulterior a avut loc migrarea proteinelor în funcție de greutatea moleculară la 20 mA/gel, aproximativ 3 ore.

După finalizarea migrării proteinelor în gel, acestea s-au transferat la 100V, timp de 2 ore pe membrane PVDF. Tamponul de transfer conține 3,03 g TRIS, 14,4 g glicină, 200 mL metanol și se aduce la 1L cu apă ultrapură (s-a păstrat la frigider câteva ore înainte de folosire). S-a realizat blocarea prin incubarea membranelor în soluție de blocare 5% (5g non-fat dry milk și TBS/Tween), pe agitator, peste noapte la 4°C.

Membranele au fost ulterior incubate cu anticorpi primari CDK4(C:22): sc-260 (Santa Cruz Biotechnology), ciclina B1(H-433):sc-752 (Santa Cruz Biotechnology) și p16(H-156): sc-759 (Santa Cruz Biotechnology) în diluție 1/200 cu TBS-Tween suplimentat 2% BSA, pentru o oră la temperatura camerei, cu agitare. Controlul pozitiv al încărcării s-a realizat cu anticorp primar de β -actină (C4): sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology).

După spălarea cu TBS-Tween, membranele au fost incubate 60 de minute cu anticorpi secundari - goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 (Santa Cruz Biotechnology) în diluție 1/10.000 cu TBS-Tween pentru CDK4, ciclina B1 și p16 și goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 (Santa Cruz Biotechnology) în diluție 1/10.000 cu TBS-Tween pentru β -actină.

Imunoreactivitatea proteinelor a fost detectată utilizând kitul Super Signali West Pico Chemiluminescent Substrat (ThermoScientific). De asemenea, se pot folosi și alte kituri având la bază principiul de chemiluminescență.

Rezultatele analizei Western blot sunt redată în figurile 5-7.

EXEMPLUL 7 – determinarea markerului seric tumoral CA 125

Pentru pacientele la care s-a realizat analiza proteomică cu identificarea de noi proteine a fost luat în studiu serul, în vederea determinării nivelului seric al markerului tumoral clasic CA 125, prin metoda Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA).

Testele VIDAS CA 125 (kit-uri BioMerieux, Franța) sunt teste automate cantitative și prin ele se realizează o măsurare cantitativă a nivelului pentru CA 125 în serul uman prin metoda ELFA realizat cu analizorul miniVIDAS. Principiul de determinare combină metoda sandwich de imunodectie cu două enzime cu o detectare finală fluorescentă (ELFA).

Valorile obținute la pacienți au variat pentru CA 125 între 48 UI/mL și 238 UI/mL cu o medie de 55,76 UI/mL ($p < 0,05$). Intervalul de referință biologic pentru CA 125 este < 35 UI/mL.

Rezultatele obținute au evidențiat o corelare statistic semnificativă între proteinele nou identificate și nivelului seric al markerului tumoral clasic CA 125 ($p < 0,05$) (figura 8).

REVENDICĂRI

Revendicare 1:

Un set de biomarkeri proteici -- **CDK4, ciclina B1** și **p16^{INK4a}** - ce constituie un instrument de diagnostic molecular pentru pacientele cu cancer de col uterin **caracterizat prin aceea că** acești biomarkeri prezintă diferențe statistice semnificative între țesutul tumoral și cel peritumoral (control/normal).

Revendicare 2:

Utilizarea semnăturii proteice corespunzând proteinelor **CDK4, ciclina B1** și **p16^{INK4a}**, ca metodă de prognostic sever pentru cancerul de col uterin, acești biomarkeri prezentând expresii crescute simultan la nivelul țesutului tumoral în raport cu țesutul peritumoral (control/normal).

FIGURI

Figura 1

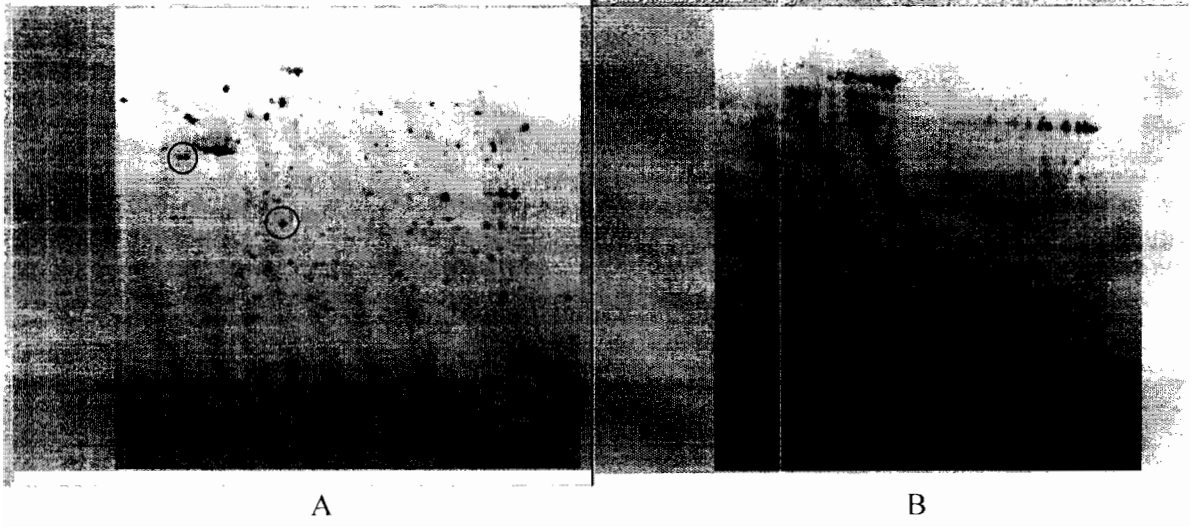


Figura 2

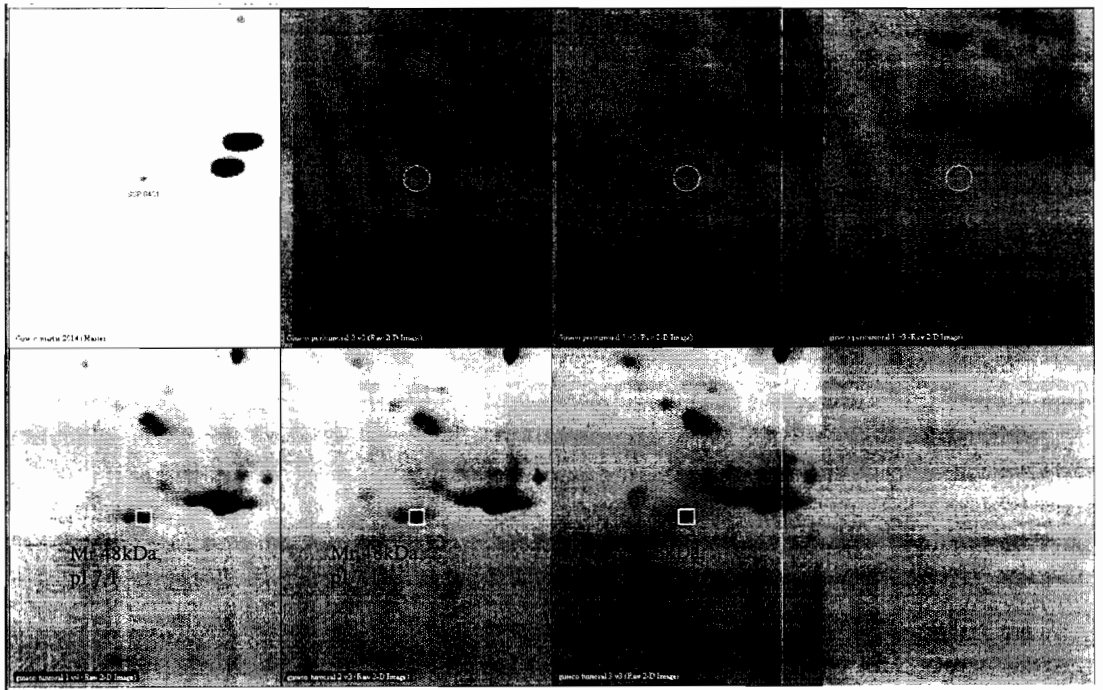


Figura 3

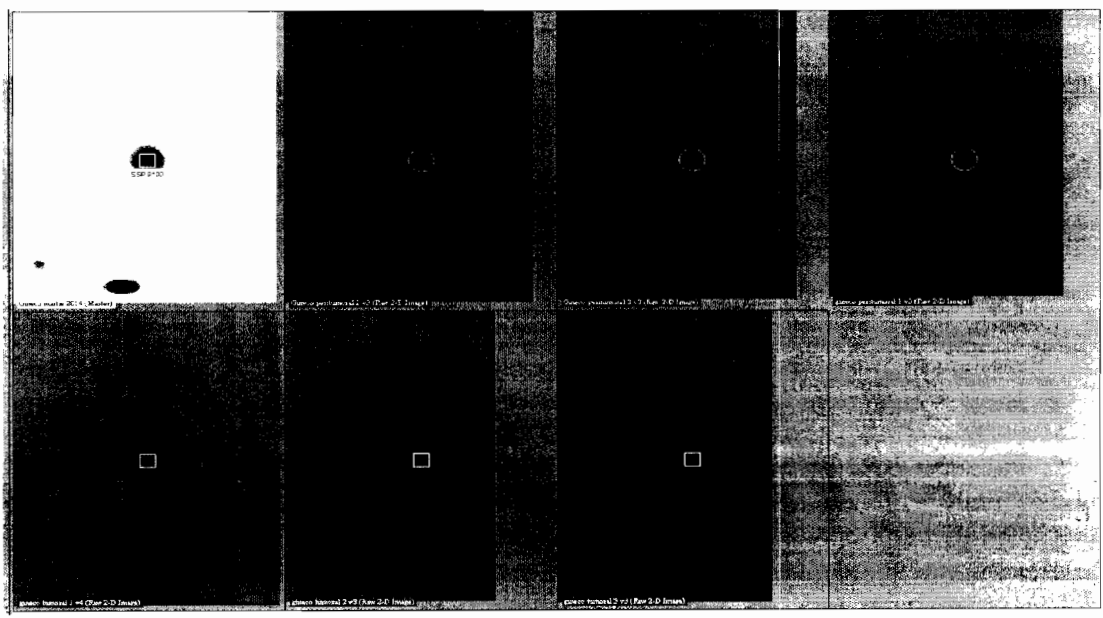


Figura 4

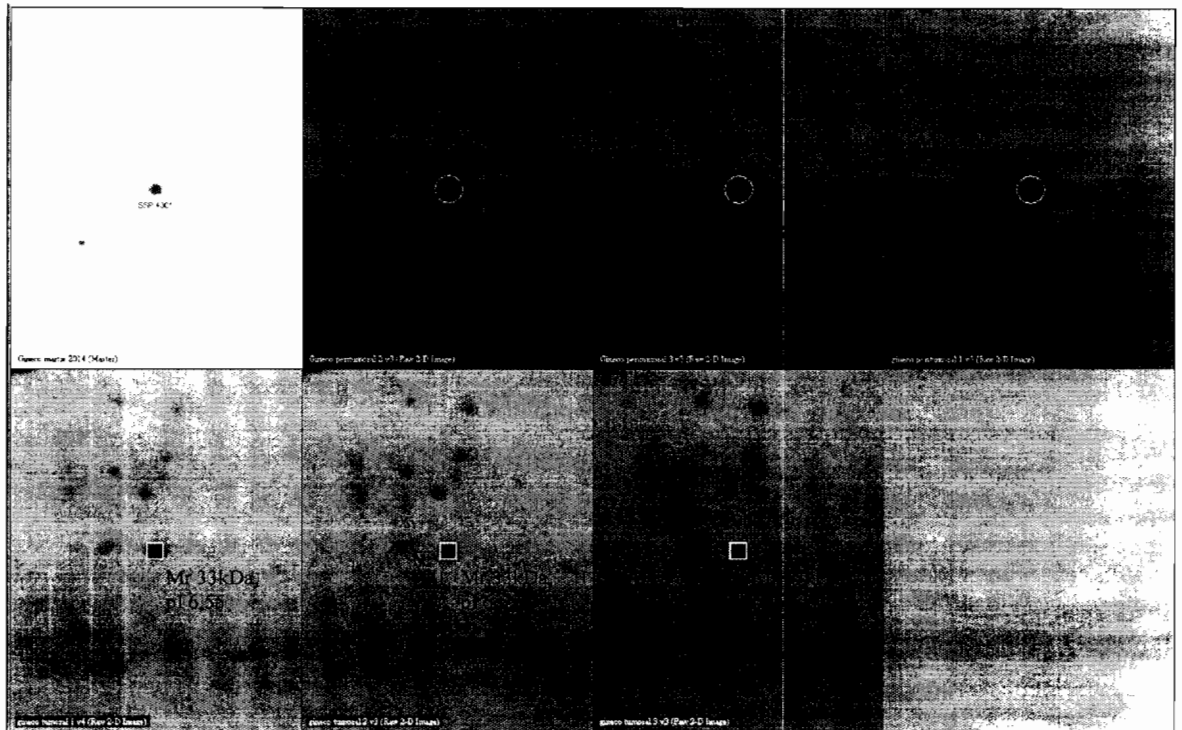


Figura 5

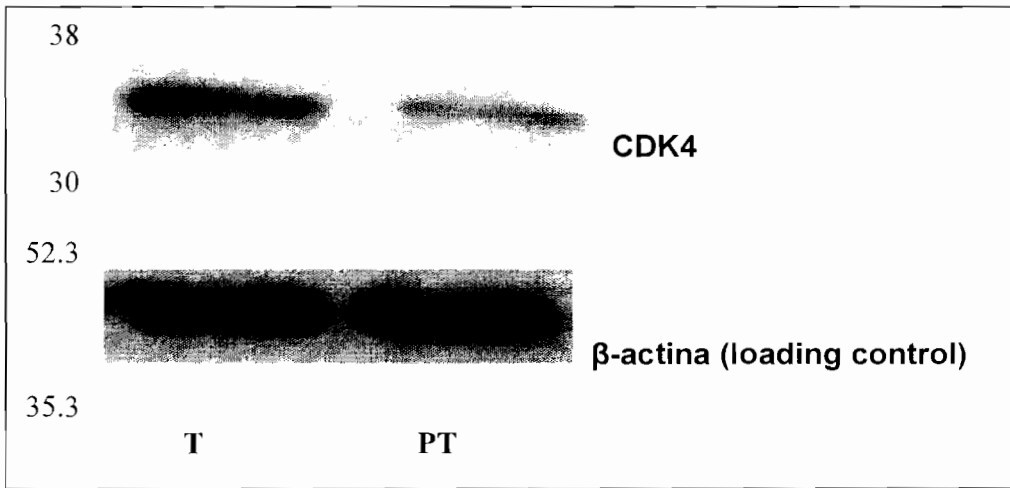


Figura 6

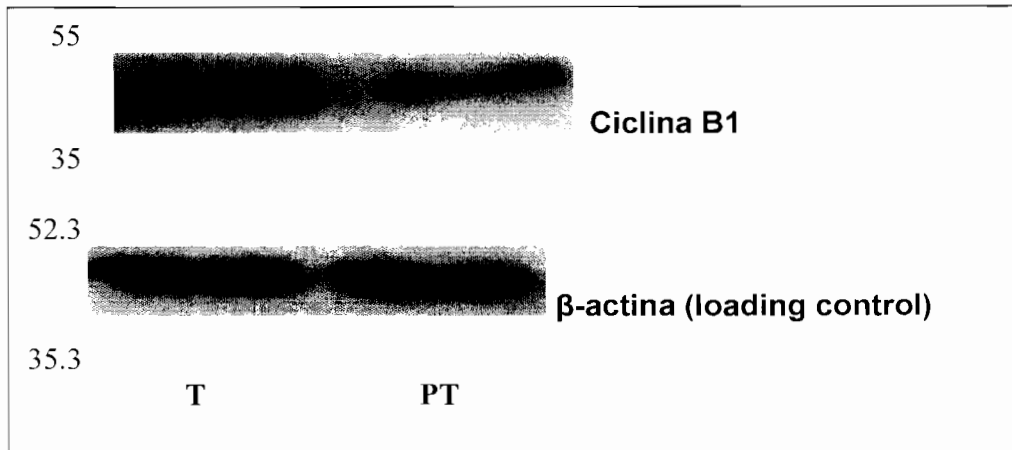


Figura 7

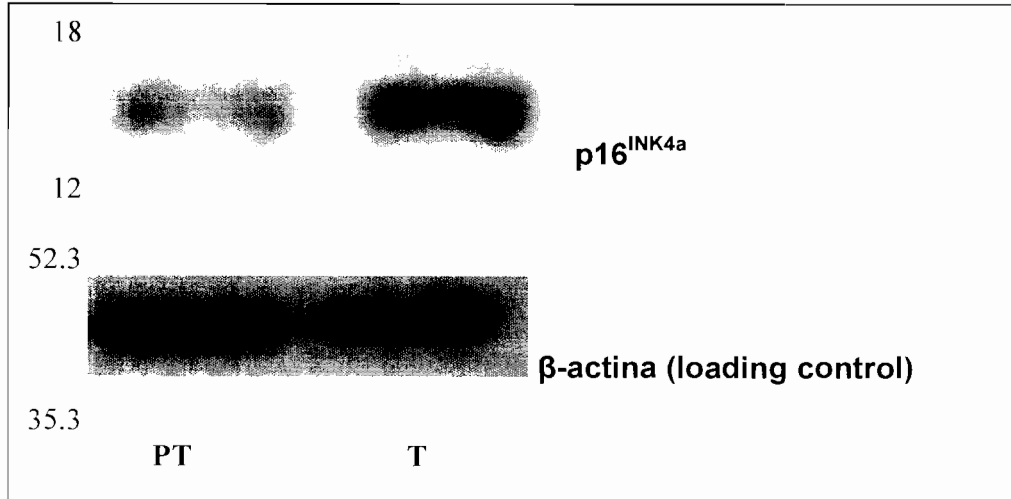


Figura 8

