

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**



***ALTERĂRI ALE CICLULUI CELULAR
ÎN PATOGENEZA CANCERULUI DE COLON***

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**Doctorand: Sonia I. Vlaicu
Conducător științific: Prof. dr. Petru A. Mircea**

2010

CUPRINS

INTRODUCERE	pag. 4
PARTEA I – DATE DIN LITERATURĂ	
CAPITOLUL 1. EPIDEMIOLOGIA ȘI FACTORII DE RISC AI CANCERULUI COLORECTAL	
1.1 Epidemiologia cancerului colorectal	pag. 7
1.2 Factorii de risc	pag. 8
1.3 Factorii de protecție	pag. 12
CAPITOLUL 2. DIAGNOSTICUL, STADIALIZAREA ȘI MANAGEMENTUL TERAPEUTIC AL CANCERULUI COLORECTAL	
2.1 Histopatologia cancerului colorectal	pag. 15
2.2 Formele de prezentare clinică a CCR	pag. 16
2.3 Managementul terapeutic al CCR	pag. 19
CAPITOLUL 3. DEREGLĂRI ALE CICLULUI CELULAR ÎN ONCOGENEZĂ	
3.1 “ABC”-ul ciclului celular	pag. 25
3.2 Controlul ciclului celular	pag. 26
3.3 Mecanismele de reglare a expresiei <i>CDKs</i>	pag. 28
3.4 Punctele de control al ciclului celular	pag. 29
3.5 Alterările ciclului celular în cancerogeneză	pag. 32
CAPITOLUL 4. BIOLOGIA MOLECULARĂ A LEZIUNILOR PREMALIGNNE ȘI MALIGNNE ALE COLONULUI	
4.1 Secvența adenom – carcinom	pag. 35
4.2 Semnificația polipului serat	pag. 38
4.3 Noțiuni de epigenetică	pag. 39
4.4 Elementele de clasificare moleculară globală a CCR	pag. 41
4.5 Carcinogeneză în bolile inflamatorii intestinale. CCR asociat colitei	pag. 44
CAPITOLUL 5. RESPONSE GENE TO COMPLEMENT (RGC)-32 – POTENȚIAL ELEMENT REGLATOR AL CICLULUI CELULAR ÎN CANCERUL DE COLON	
5.1 Rolul RGC-32 în proliferarea celulară	pag. 46
5.2 RGC-32 în cancer	pag. 47
 PARTEA A II-A – CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
CAPITOLUL 1. INTRODUCERE	pag. 50
CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE	pag. 52
CAPITOLUL 3. REZULTATE	pag. 61
CAPITOLUL 4. DISCUȚII	pag. 95
CAPITOLUL 5. CONCLUZII	pag. 108
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	pag. 110

INTRODUCERE

Studii exhaustive centrate pe modificările genetice în cancerul colonic au făcut ca acesta să capete și să își mențină, timp de decenii, statutul de model pentru ilustrarea bazelor genetice ale cancerogenezei. De dată recentă însă, neoplazia colonică este descrisă în egală măsură ca un prototip pentru exemplificarea rolului modificărilor epigenetice în tumorigeneză.¹

Response Gene to Complement-32 (RGC-32), descrisă și clonată pentru prima dată în 1998 de către echipa formată de Rus și colaboratorii, este implicată în controlul ciclului celular în celulele musculare netede aortice umane, fiind substrat și element reglator al activității CDC2.² Totodată, dereglarea expresiei RGC-32 a fost descrisă într-o gamă largă de neoplazii.³

În lucrarea de față ne-am propus să conturăm valențele RGC-32 în oncogeneza cancerului de colon. Am investigat expresia RGC-32 în mucoasa colonică normală, în leziuni precursore ale neoplaziei colonice și în mucoasa colonică transformată malign prin metode de imunohistochimie. Am urmărit apoi profilul transcripțional al genelor influențate de blocarea expresiei RGC-32 în linia celulară de adenocarcinom colonic SW480. Exploatând faptul că inactivarea RGC-32 induce expresia unui grup de gene implicate în asamblarea cromatinei, am demonstrat asocierea dintre RGC-32 și procesele de acetilare și metilare a histonelor. În plus, am arătat că inactivarea RGC-32 duce la accelerarea progresiei ciclului celular în linia celulară de colonocite canceroase SW480. Aceste date atrag atenția asupra impactului dereglării expresiei RGC-32 în carcinogeneza colonică și asupra implicării sale – prin inducerea modificărilor epigenetice ale histonelor – în reglarea proceselor de asamblare a cromatinei.

PARTEA I – DATE DIN LITERATURĂ

CAPITOLUL 1. EPIDEMIOLOGIA ȘI FACTORII DE RISC AI CANCERULUI COLORECTAL

Incidența cancerului colorectal la pacienții cu risc mediu este de aproximativ 5%; astfel, unul din 18 bărbați și una din 19 femei va dezvolta cancer colorectal pe parcursul vieții.⁴ Riscul de apariție a cancerului colorectal (CCR) este influențat atât de factori genetici, cât și de factori de mediu. Printre factorii de risc cu impact asupra dezvoltării CCR se numără: antecedentele personale patologice și cele heredo-colaterale, factorii genetici precum polipoza adenomatoasă familială, cancerul colorectal ereditar nonpolipozic, bolile inflamatorii intestinale.⁵ O paletă largă de studii centrate pe evaluarea asocierii dintre obezitate, sindrom metabolic, insulino-rezistență și CCR reliefează importanța dezechilibrului balanței energetice în carcinogeneza CCR.^{6, 7} La un risc crescut de a dezvolta CCR se supun și consumatorii de carne roșie și carne procesată, precum și cei cu comportamente precum fumatul și consumul de alcool. Dintre factorii de protecție, îi amintim pe cei de tip macronutrienți (consumul de fructe, legume și aportul crescut de fibre) și de tip micronutrienți (acidul folic, calciul, magneziul, vitaminele D și B6), insistând asupra acelei medicații din categoria factorilor de protecție care ar putea servi drept mijloc de profilaxie eficient pentru prevenirea apariției CCR.⁵

CAPITOLUL 2. DIAGNOSTICUL, STADIALIZAREA ȘI MANAGEMENTUL TERAPEUTIC AL CANCERULUI COLORECTAL

Explorările diagnostice ale CCR includ colonoscopia totală cu prelevare de biopsii, irigografia cu dublu contrast cuplată cu sigmoidoscopia flexibilă sau colonografia CT, iar cele destinate stadializării – tomografia computerizată, RMN cu rezoluție înaltă și evaluarea intraoperatorie.⁸ Clasificarea Dukes, modificată de Astler-Coller, și sistemul TNM, conceput de American Joint Committee on Cancer (AJCC), sunt instrumentele folosite la estimarea

prognosticului și planificarea schemelor terapeutice.⁸ Chirurgia reprezintă singura formă de terapie curativă pentru cancerul de colon localizat și o opțiune potențial curativă pentru o parte din pacienții cu boală metastatică limitată.⁹ Clasică terapie adjuvantă (folosind 5-FU, Leucovorin și Oxaliplatin) își găsește actualmente completarea în terapiile cu țintă moleculară, atât cele deja consacrate (anticorpi monoclonali împotriva VEGF și EGFR), cât și cele aflate în stadiul experimental (agenți direcționați împotriva receptorilor membranari, împotriva rețelelor de semnalizare intracelulare, sau a proteinkinazelor care reglează ciclul celular).⁸

CAPITOLUL 3. DEREGLĂRI ALE CICLULUI CELULAR ÎN ONCOGENEZĂ

Alterări ale ciclului celular asociate cancerogenezei pot surveni prin mutații ale genelor care codifică proteinele practic la *orice* nivel al ciclului celular: CDK, ciclone, enzime activatoare ale CDK, inhibitorii CDK, substratul CDK, proteine implicate în punctele de control G1/S, G2/M, tranziția metafază/anafază.¹⁰ Până în prezent a fost identificată o varietate impresionantă de proto-oncogene și gene supresoare tumorale implicate în dereglarea controlului ciclului celular. Căile lor de semnalizare par să convergă înspre mecanismul tranziției din faza G1 în faza S. Invalidarea căii de semnalizare Rb-E2F și a celei guvernate de p53 constituie o marcă a oncogenezei.¹¹

CAPITOLUL 4. BIOLOGIA MOLECULARĂ A LEZIUNILOR PREMALIGNNE ȘI MALIGNNE ALE COLONULUI

Modelul de cancerogenăză colorectală conceput de Vogelstein și Fearon în 1990 definea neoplazia colonică ca o entitate omogenă, calea sa patogenetică fiind asimilată unei secvențe uniforme și liniare de pași.¹²

Fiecărei trepte de progresie din secvența *cripte focale aberante* → *adenom* → *carcinom* îi corespunde un anumit eveniment genetic. Toate aceste evenimente genetice sunt trecute în revistă în mod detaliat: mutațiile oncogenelor (RAS/BRAF), precum și inactivarea genelor supresoare tumorale (calea semnalizării Wnt – APC – β-catenină, p53, genele DCC și SMAD).¹³ O altă leziune precursoră în tumorigeneza colonică, leziune cu caracteristici histopatologice distincte, este reprezentată de către polipul serat.¹⁴

O preocupare aparte în cercetările recente privind CCR o constituie modificările epigenetice (modificarea proteinelor histone, metilarea ADN-ului, ARN interferența) care contribuie la cancerogeneza CCR. O multitudine de gene sunt inactivate prin metilarea promoterului în neoplazia colorectală: gene ale căii de semnalizare Wnt (APC, familia de gene SFRP), gene de stabilitate celulară (*MGMT*, *MLH1*), gene reglatoare ale ciclului celular (*CHFR*, p14^{ARF}, p16), gene implicate în diferențiere și apoptoză (*GATA4*, *GATA 5*). Inactivarea epigenetică creează premisele unui mediu propice mutațiilor selective ale proto-oncogenelor și ale genelor supresoare tumorale, facilitând progresia tumorală.^{1, 15, 16} Printre elementele de clasificare moleculară globală a CCR, se numără instabilitatea cromozomială (CIN, instabilitatea microsateliților (MSI) și fenotipul de metilare a insulelor CpG (CIMP). Existența a două căi patogenetice paralele în CCR este evidentă: una dintre ele caracterizată prin instabilitate cromozomială CIN, mutația genei APC și K-RAS, apariția adenomului convențional și tumora localizată distal (cale dominată de modificări genetice), cealaltă implicând fenotipul metilator CIMP, mutația genei BRAF, neoplazia având drept leziune precursoră polipul serat (cale în care predomină modificările epigenetice).¹

Modelul carcinogenezei din bolile inflamatorii intestinale (BII) nu este complet superpozabil peste cel din CCR sporadic, prezentând particularități în ceea ce privește leziunile precusoare, tipul de instabilitate genomică predominant, *timing*-ul și frecvența inactivării genelor supresoare tumorale, sau a mutațiilor oncogenelor.¹⁷

CAPITOLUL 5. RESPONSE GENE TO COMPLEMENT (RGC)-32 – POTENȚIAL ELEMENT REGLATOR AL CICLULUI CELULAR ÎN CANCERUL DE COLON

Gena Response gene to complement (RGC)-32 a fost clonată pentru prima dată prin metoda *display*-ului diferențial din oligodendrocite de șobolan, când Badea și colaboratorii investigau care anume gene sunt exprimate diferențiat ca răspuns la activarea complementului în celulă.¹⁸ RGC-32 acționează ca substrat și element reglator al activității CDC2, iar supraexprimarea acestei proteine în celulele musculare netede aortice umane induce intrarea în faza S și intrarea în G2/M.² RGC-32 a fost găsită supraexprimată în cancerul de colon, ovarian, mamar, carcinom prostatic și limfom cutanat cu celule T, date care sugerează un rol complex pentru RGC-32 în cancer.³

PARTEA A II-A – CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

CAPITOLUL 1. INTRODUCERE

Pivotul oricărui proces de cancerogeneză (deci și al carcinogenezei colonice) este reprezentat de proliferarea celulară necontrolată, haotică, pentru care sunt responsabile modificările genelor implicate în controlul ciclului celular. Astfel, în dezvoltarea CCR au fost documentate numeroase alterări ale elementelor reglatoare ale ciclului celular. După cum s-a demonstrat în prealabil, RGC-32 este supraexprimată în cancerul de colon. Obiectivul nostru în această lucrare a fost să descriem variația expresiei RGC-32 în mucoasa colonică normală, leziuni benigne cu potențial de transformare malignă, respectiv în adenocarcinoame colonice de diverse stadii. Prin metoda “gene array” am identificat genele exprimate diferențial consecutiv anihilării expresiei genice RGC-32 în linia celulară de adenocarcinom colonic uman SW480. Am investigat ulterior asocierea dintre *knock-down*-ul RGC-32 și modificări epigenetice precum procesele de acetilare sau metilare a histonelor. În scopul de a contura rolul RGC-32 în ceea ce privește controlul ciclului celular în celulele canceroase colonice, am evaluat modificările pe care inactivarea RGC-32 le induce în progresia fazelor ciclului celular.

CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE

Pentru studiul colorației RGC-32 prin metoda imunoperoxidazei indirecte, s-au folosit mai multe matrice de microșesut comandate de la firme de profil și blocuri parafinate conținând fragmente bioptice obținute în timpul examinărilor colonoscopice efectuate în serviciul Gastroenterologie, Clinica Medicală 1. Experimentele de transfecție au fost realizate pe linia celulară de adenocarcinom colonic SW480, folosind plasmidele de expresie shRGC-32 și, respectiv, shCTR. Pentru cuantificarea expresiei genice a diverselor gene de interes, am folosit metoda Real-time PCR. Pentru caracterizarea expresiei genice RGC-32 în cancerul de colon, am utilizat matricea TissueScan Tissue qPCR. Pentru analiza de tip matrice de expresie oligonucleotidică, s-a folosit matricea “OHU16K Human 16K 70-mer oligonucleotide cancer array”. Matricea OHU16K numără 16.766 gene și a fost imprimată în sediul Yale University Keck Microarray Center (New Haven, CT). Expresiile proteinelor investigate au fost evaluate folosind metoda Western Blott. În linia celulară de colonocite maligne umane SW480, sinteza ADN-ului a fost evaluată prin încorporarea 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), iar conținutul ADN, prin intermediul 7-aminoactino-mycin D (experimentele care au urmărit efectul inactivării RGC-32 asupra fazelor ciclului celular).

CAPITOLUL 3. REZULTATE

Expresia RGC-32 în mucoasa colonică normală, leziuni precursoare în cancerogeneza colonică și în mucoasa colonică transformată malign

“Real-time” PCR cantitativ

Pentru a caracteriza modulațiile expresiei RGC-32 în diversele stadii ale cancerului de colon, am folosit real-time PCR cantitativ și, pentru a evalua expresia genică, o matrice de cADN de cancer de colon tip “TissueScan” (Origene). Rezultatele obținute au relevat un nivel mai scăzut al expresiei RGC-32 în țesuturile CCR stadiul I, în comparație cu stadiile II-IV. Analiza real-time PCR cantitativ a pus în evidență, de asemenea, niveluri semnificativ mai mari ale expresiilor RGC-32 în adenocarcinoamele colonice de stadiul II decât în cele aflate stadiul I ($p=0.0301$, testul t Student). Nivelurile expresiilor mRNA RGC-32 au fost mai scăzute în stadiile III și IV decât în stadiul II, dar superioare celor din adenocarcinoamele colonice de stadiu I; aceste diferențe nu au atins însă semnificație statistică.

Colorația imunohistochimică

Eșantioanele de mucoasă colonică normală, adenoamele mici și cele de mucoasă cu inflamație cronică non-neoplazică s-au colorat slab pentru RGC-32. Expresia RGC-32 în mucoasa normală s-a cantonat, de preferință, la celulele mezenchimale din spațiul interstițial. Interesantă a fost observația că doar 67% dintre eşantioanele de mucoasă colonică normală au fost pozitive pentru RGC-32, în timp ce procentul pozitivității pentru RGC-32 al eşantioanelor de mucoasă normală rezecată din colonul pacienților cu adenocarcinom colonic a fost de 100%.

Majoritatea mostrelor de adenoame mari au exprimat RGC-32, iar nivelul de colorație a fost mai intens decât în cazul adenoamelor mici. În 42% dintre adenoamele mari s-a decelat o colorație de intensitate ridicată, comparativ cu cele 11% din rândul adenoamelor mici. În plus, diferența înregistrată în ceea ce privește intensitatea colorației RGC-32 între adenoamele mari și eşantioanele de mucoasă normală a atins semnificația statistică ($p=0,02$; testul exact al lui Fischer).

În ceea ce privește adenocarcinoamele colonice, s-au pus în evidență două modele de imunoreactivitate a RGC-32: în unele tumori, colorația era vizibilă doar în celulele epiteliale maligne, în timp ce, în altele, reactivitatea RGC-32 putea fi observată atât în epiteliul malign, cât și în celulele interstițiale. În majoritatea eşantioanelor examinate, RGC-32 s-a localizat intracitoplasmatic; în câteva dintre eşantioanele examinate a fost observată și colorația RGC-32 intranucleară. Diferențele între distribuția intensității colorației adenocarcinoamelor și cea a adenoamelor au fost înalt semnificative statistic ($p=0,002$; testul exact al lui Fischer), întocmai ca și cele dintre adenocarcinoame și eşantioanele de mucoasă normală ($p=0,001$; testul exact al lui Fischer). S-a constatat tendința intensității colorației RGC-32 de a se corela cu stadiul TNM al tumorilor maligne: 21% dintre eşantioanele de adenocarcinom stadiul T1/T2, 45% dintre adenocarcinoamele stadiul T3/T4, 43% dintre metastazele limfatice ale cancerelor de colon și, respectiv, 57% dintre metastazele în alte organe la distanță ale CCR s-au colorat intens pozitiv pentru RGC-32. Diferențele între aceste procente nu au fost însă semnificative din punct de vedere statistic.

Având în vedere faptul că bolile inflamatorii intestinale cu durată prelungită incumbă un risc crescut pentru CCR, am ales să investigăm și expresia RGC-32 în colita ulcerativă și boala Crohn. Astfel, eşantioanele a 12 dintr-un total de 13 pacienți diagnosticați cu boli inflamatorii intestinale au fost pozitive pentru RGC-32. Diferențele de intensitate a colorației RGC-32 între țesuturile cu BII și adenocarcinoame au fost semnificative statistic ($p=0,046$; testul exact al lui Fischer).

Efectul inactivării genei RGC-32 (“knockdown”) asupra expresiei genice în linia celulară de cancer de colon SW480

În scopul investigării efectului produs de inactivarea genei RGC-32 asupra profilului transcripțional într-o cultură de colonocite canceroase – linia celulară SW480 – am folosit o matrice (“array”) de oligonucleotide. Inactivarea genică a fost eficientă, obținându-se atât o reducere de 90% a expresiei mRNA-ului RGC-32 (cuantificat prin metoda real-time PCR), cât și o reducere de peste 90% a expresiei proteinei RGC-32 (evaluată prin metoda Western Blott) în celulele transfectate cu shRGC-32, comparativ cu celulele control transfectate cu shCTR.

Blocarea expresiei genei RGC-32 în celulele SW480 a avut un impact semnificativ în ceea ce privește profilul transcripțional. După restrângerea acestui profil la acele gene la care s-a constatat o modificare de cel puțin 1,5 ori față de valoarea inițială, am regăsit în acest profil 230 de gene a căror expresie este reglată în mod diferit pentru colonocitele cu deficit de expresie a RGC-32, față de cele transfectate cu controlul shCTR.

Conform analizei microarray-ului, cele mai supraexprimate gene au fost: WEE1 (supraexprimată de 9 ori), gena proteinei 1 asociată lui RAD51 (supraexprimată de 7,5 ori), gena care codifică proteina LSM2, asociată ARN-ului mic nucleolar U6 (supraexprimată de 4,2 ori) și membrul G al familiei de histone H2B (genă supraexprimată de 3,1 ori). Am remarcat și faptul că inactivarea expresiei genice RGC-32 a condus la subexpresia unui număr relativ mic de gene (51), dintre care amintim: fosfodiesteraza 6D cGMP-specifică – subunitatea delta (subexprimată de 55 ori), proteina A2 asociată surfactantului pulmonar (subexprimată de 4,5 ori), *metallothionein* 1G (subexprimată de 2,6 ori) și β -catenina (subexprimată de 2,4 ori).

Genele a căror expresie a fost modulată de către inactivarea RGC-32 au fost caracterizate detaliat după criteriul rolului lor în diverse procese biologice, folosind baza de date Gene Ontology.¹⁹ Categoria GO de asamblare a cromatinei a inclus: membri ai familiei histonei 2B, proteina 1 de asamblare a nucleozomului, precum și *pyrroline-5-carboxylate* reductaza 1. Printre genele clasificate în categoria GO de reglare a ciclului celular se numără: WEE1, CDC20, CDC25B, genele codificatoare ale proteinelor 14-3-3 sigma, prohibitinei, Septinei 9 și C-MYC.

Analiza real-time PCR

Exprimarea diferențială a unora dintre genele identificate prin analiza *microarray* a fost apoi confirmată prin metoda real-time PCR. Această verificare a fost realizată pentru genele WEE1, RAD51 associated protein 1 și histona H2BD, gene a căror expresie a fost cel mai mult modificată în sens pozitiv conform analizei microarray-ului. Rezultatele obținute prin real-time PCR au fost concordante cu cele din microarray. Mai exact, cuantificarea rezultatelor real-time PCR și a celor corespunzătoare microarray-ului a generat date cu aceeași *direcție* a modificării expresiei, însă *magnitudinea* acestei modificări nu a fost identică în fiecare caz. Am determinat și nivelul expresiei mRNA pentru genele p53, p21, E-cadherin (CDH1) și β -catenină: nivelul mRNA p53 a crescut după inactivarea RGC-32, în vreme ce nivelurile CDH1, p21 și β -catenină au scăzut.

Efectul inactivării RGC-32 asupra modificărilor histonelor

Având în vedere modificările semnificative ale expresiei membrilor familiei histonei H2B consecutiv anihilării produsului genei RGC-32, ne-am îndreptat atenția asupra acestei familii de gene. Aceste modificări în expresia histonei H2B au fundamentat ipoteza posibilei afectări a proceselor de acetilare și metilare a histonelor prin inactivarea genei RGC-32.

Pentru a verifica această ipoteză, ne-am folosit de tehnica Western Blott pentru a detecta expresia histonelor și a formelor acetilate ale histonelor H2A, H2B, H3, și H4. Fiecare modificare a histonelor a fost raportată la nivelul actinei și la nivelul total de histone. Am considerat semnificativă o modificare a histonelor și a expresiei HDAC superioară valorii de 1,5 ori. Am constatat o creștere semnificativă a acetilării histonei H2B la poziția K5 și K15, a histonei H3 la poziția K9 și K18, cât și a histonei H4 la poziția K8 ca urmare a inactivării RGC-32. În mod

contrastant, acetilarea histonelor H2A la K9 nu a fost influențată de inactivarea RGC-32. Cu toate acestea, blocarea expresiei genice a RGC-32 a condus la diminuarea expresiei deacetilazei histonelor SIRT1 și a expresiei H3K27me3. Aceste date sugerează că RGC-32 induce variații epigenetice potențial responsabile pentru unele dintre efectele acestei gene – inclusiv cele asupra ciclului celular.

Efectul inactivării genei RGC-32 asupra ciclului celular

shARN RGC-32 și shARN Luciferaza au fost transfectate tranzitor în celulele SW480. Post-transfecție, celulele au fost sincronizate din punct de vedere al fazelor ciclului celular (fiind toate forțate să intre în G0) prin supunerea lor la o perioadă de starvare de 18 ore. Mediul celulelor a fost apoi înlocuit cu mediu de cultură conținând 10% ser fetal bovin (FBS) pentru un interval de 18 ore și apoi pulsate pentru o oră cu BrdU. Procentul celulelor SW480 transfectate cu shRGC-32 aflate în faza ciclului celular G0/G1 a fost semnificativ inferior din punct de vedere statistic procentului de celule transfectate cu shCTR în G0/G1 (67,07% versus 73,67%, diferența=6,6%, p=0,024, testul *t* Student). Numărul celulelor care au intrat în faza S (13,06% versus 9,66%, diferența=3,4%, p=0,046, testul *t* Student) și respectiv în faza G2/M (19,87% versus 16,66%, diferența=3,2%, p=0,009, testul *t* Student) a fost semnificativ mai mare pentru celulele SW480 la care s-a inactivat RGC-32, comparativ cu SW480 transfectate cu control.

CAPITOLUL 4. DISCUȚII

În studiul de față, absența unei colorații intense pentru RGC-32 în țesutul colonic normal, procentul relativ mic de adenoame intens colorate și faptul că adenocarcinoamele au fost intens pozitive pentru RGC-32 sugerează un posibil rol al dereglării expresiei RGC-32 în carcinogeneza colonică.²⁰

Procentul de eșantioane de colită ulcerativă și boala Crohn care s-au colorat intens cu RGC-32 a fost superior celui de fragmente bioptice din mucoasa colonică normală și celui de adenoame mici.²⁰ Acest rezultat semnalează posibilitatea ca expresia RGC-32 să se coreleze cu activitatea proliferativă în bolile inflamatorii intestinale și că RGC-32 ar putea să contribuie la apariția secvenței displazie–carcinom aferentă acestei patologii. Un astfel de pattern de colorare imunohistochimică au raportat și Ioachim și colaboatorii pentru ciclina D1, ciclina E și CDK inhibitorul p21, expresiile lor fiind superioare în mucoasa recoltată de la pacienți cu boli inflamatorii intestinale, comparativ cu eșantioanele de mucoasă normală. Acest comportament s-a corelat atât cu turnover-ul celular epitelial, cât și cu existența leziunilor displazice din țesuturile pacienților cu boli inflamatorii intestinale.²¹

Până în prezent, componentele rețelei de proteine a căror expresie este reglată de RGC-32/interconectate cu RGC-32 și rolul lor în tumorigeneză nu se cunosc foarte bine. Pentru a elucida această problemă, am preferat în studiul nostru o abordare genomică, folosind “gene profiling” pentru a identifica acele gene care își modifică expresia consecutiv inactivării RGC-32. După știința noastră, aceasta este prima analiză de tip transcriptom care evaluează efectul inactivării RGC-32 în linii celulare tumorale. În această cercetare, am arătat că RGC-32 are un impact semnificativ în ceea ce privește reglarea transcripției în linia celulară de adenocarcinom colonic SW48 “Data mining” prin Gene Ontology a rafinat caracterizarea profilului genic obținut după anihilarea produsului genei RGC-32, indicând faptul că genele asupra cărora RGC-32 a avut cel mai semnificativ impact în reglarea transcripției sunt gene implicate în asamblarea cromatinei.²⁰ Acest rezultat surprinzător a impus în continuare investigarea efectului inactivării RGC-32 asupra modificărilor histonelor. Datele obținute din aceste experimente au indicat faptul că RGC-32 joacă un rol important în reglarea acetilării histonelor, proces care, la rândul lui, induce activarea transcripției. Astfel, cele de mai sus constituie argumente pentru ipoteza conform căreia *alterările epigenetice controlate de RGC-32 sunt implicate în reglarea ciclului celular în celulele canceroase.*

Modificările histonelor pot afecta gradul și modul în care ADN-ul este compactat și, prin urmare, disponibilitatea lui pentru atașarea factorilor de transcripție.²² Pentru a produce hiperacetilarea histonei H3 și H4 în liniile celulare de cancer de colon Colo-320 și SW116, Fang și echipa sa au folosit doi inhibitori ai deacetilazelor histonelor (HDACs), butirat de sodiu și TSA – trichostatin; acest tratament a dus la re-exprimarea inhibitorului ciclului celular p21 și la blocarea ciclului celular în faza G1.²³ În țesutul de carcinom gastric, histona H3 s-a dovedit a fi hipoacetilată în regiunea promoterului p21, asociindu-se astfel cu reducerea expresiei lui p21.²⁴ Toate aceste date semnaleză potențiala (re)inducție a expresiei p21 în liniile celulare de cancer de colon după hiperacetilarea histonelor. În mod contrastant, datele noastre au relevat o scădere semnificativă a expresiei p21 și a CDH1 (E cadherina, o altă genă cu funcție de supresor tumoral) după inactivarea RGC-32.²⁰

În plus, am constatat că inactivarea RGC-32 s-a asociat cu o reducere a expresiei SIRT1 și a trimetilării histonei H3 la poziția K27.²⁰ Scăderea expresiei acestei histon deacetilaze de clasă III – SIRT1 – este perfect compatibilă cu creșterea nivelului de acetilare a histonelor consecutiv inactivării RGC-32. O explicație patentă ar fi ca acea augmentare a nivelului de acetilare pe care o descriem noi să fie secundară reducerii expresiei SIRT1. Trebuie amintite și datele furnizate de Firestein et al, care au raportat că SIRT1 este capabil să suprimă dezvoltarea cancerului de colon într-un model murin de cancer de colon, model în care carcinogeneza se datorează dereglării căii Wnt-β-catenin-APC.²⁵ Metilarea H3K27 este asociată într-un mod specific cu genele inactivate, dormante din punct de vedere transcripțional, iar o reducere în metilarea H3K27 (ca și cea observată în datele noastre) ar putea fi – măcar parțial – responsabilă de activarea concomitentă a ciclului celular.²⁶

Astfel, rezultatele noastre sugerează faptul că un nivel crescut de RGC-32 ar favoriza deacetilarea histonelor, probabil via creșterii expresiei histon deacetilazelor și a **H3K27** trimetilării, având ca finalitate condensarea cromatinei și inactivarea genică.

Blocarea expresiei genice a RGC-32 a produs o creștere modestă, dar semnificativă, asupra progresiei ciclului celular la nivelul liniei celulare de colonocite canceroase SW480.²⁰ Supraexpresia RGC-32 a întârziat progresia mitozei în celulele purtătoare de neoplasm uterin HeLa, iar analize imunohistochemice au relevat faptul că proteina RGC-32 se găsește concentrată la nivelul centrozomilor și a fusurilor de diviziune în timpul mitozei.²⁷ RGC-32 este și una dintre genele candidate supresor tumoral inactivate prin mecanisme epigenetice și apoi re-exprimate consecutiv “demascării” farmacologice. Takai și colaboratorii, folosind linii celulare de cancer endometrial tratate cu un inhibitor al metilării ADN și cu un inhibitor al deacetilării histonelor, au identificat RGC-32 între cele 5 gene complet inactivate ca expresie pre-tratament și supraexprimate post-tratament.²⁸ Luând în considerare faptul că RGC-32 este capabil să inducă ciclul celular în celule primare non-neoplazice,^{2, 18, 29} se conturează ipoteza conform căreia proteina RGC-32 joacă un rol dual: rol de activator al ciclului celular în celule primare și cel de supresor tumoral în celulele neoplazice. Astfel, caracteristicile histologice ale țesutului, diverșii liganzi care interacționează cu RGC-32, nivelul și activitatea RGC-32 ar putea manevra “cârma” statusului proliferativ într-un anumit set de celule, direcționându-le fie înspre accelerarea proliferării, fie, din contră, înspre blocarea progresiei ciclului celular. Roluri duale precum cel amintit au mai fost raportate și pentru alți factori așa cum sunt TGF-β și RUNX1.^{30, 31} Expresia RGC-32 poate fi indusă de către TGF-β; prin prisma acestei relații, efectul antiproliferativ exercitat de TGF-β în carcinogeneza colonică este în consonanță cu efectul inhibitor al RGC-32 asupra progresiei ciclului celular în colonocitele canceroase.

CAPITOLUL 5. CONCLUZII

Datele obținute din experimentele de imunohistochimie, cu creșterea progresivă a colorației RGC-32 de la mucoasa normală la carcinom colonic (trecând prin adenoame mici și mari), indică un potențial rol al dereglării expresiei RGC-32 în carcinogeneza colonică. În lucrarea de față este prezentată prima analiză de tip transcriptom care evaluează efectul inactivării RGC-32 în linii celulare tumorale. Blocarea expresiei genei RGC-32 influențează semnificativ profilul transcripțional al celulelor de adenocarcinom colonic SW480. Genele asupra cărora inactivarea RGC-32 a avut un impact major îndeplinesc funcții importante pentru diviziunea celulară: asamblarea cromatinei, asamblarea complexului ADN, controlul ciclului celular și procesarea ARN. Anihilarea produsului genic RGC-32 se asociază atât cu creșterea acetilării histonelor H2B, H3 și H4, cât și cu scăderea expresiei histon deacetilazei SIRT1 și a expresiei formei trimetilate a histonei H3 (H3K27me3). Datele noastre sugerează faptul că RGC-32 joacă un rol important în inducerea modificărilor epigenetice ale histonelor și că este implicat în cancerogeneza colonică prin reglarea proceselor de asamblare a cromatinei. RGC-32 este implicat în reglarea progresiei ciclului celular la nivelul liniei celulare de colonocite canceroase SW480, de vreme ce inactivarea sa are ca rezultat accelerarea acestei progresii. Astfel, proteina RGC-32 ar putea deține funcții duale: funcție de activator al ciclului celular în celule primare și, deopotrivă, cea de supresor tumoral în celulele neoplazice, aceste două valențe fiind potențial modulate de caracteristicile histologice ale țesutului, de nivelul și activitatea RGC-32 și de diferiți liganzi care interacționează cu RGC-32. Pentru caracterizarea mai detaliată a funcțiilor acestei gene și a rețelei ei de interacțiune cu ceilalți determinanți ai ciclului celular sunt necesare studii suplimentare. Conceperea unui șoarece *knockout* RGC-32 (*work in progress*) va aduce o contribuție prețioasă la rafinarea descrierii acestei gene și, luând în considerare implicarea RGC-32 în cancerogeneza colonică, aceste descoperiri și-ar putea găsi aplicația în elaborarea de noi terapii experimentale oncologice și/sau gastroenterologice.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* 2007;56(1):140-8.
2. Badea T, Niculescu F, Soane L, et al. RGC-32 increases p34CDC2 kinase activity and entry of aortic smooth muscle cells into S-phase. *J Biol Chem* 2002;277(1):502-8.
3. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, et al. Role of response gene to complement 32 in diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2008;56(2):115-22.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 2008;58(2):71-96.
5. Ahnen D, Macrae F. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. In: *UpToDate Online* version 17.3; 2010.
6. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *The Journal of Nutrition* 2001;131(11 Suppl):3109S-20S.
7. Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *The American journal of Clinical Nutrition* 2007;86(3):s836-42.
8. Ahnen D, Macrae F. Clinical manifestations, diagnosis, and staging of colorectal cancer. In: *UpToDate Online* version 17.3; 2010.
9. Rodriguez-Bigas M. Surgical management of primary colorectal cancer. In: *UpToDate Online* version 17.3; 2010.
10. Laiho M, Latonen L. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. *Annals of medicine* 2003;35(6):391-7.
11. Malumbres M, Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle Research* 2003;5:5-18.
12. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
13. Calvert P, Frucht H. Molecular genetics of colorectal cancer. In: *UpToDate Online* version 17.3; 2010.
14. Jass JR, Talbot IC. Molecular and cellular biology of pre-malignancy in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2001;15(2):175-89.
15. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer* 2006;6(2):107-16.
16. Grønbæk K. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007;115(10):1039-59.

17. Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2009;6(5):297-305.
18. Badea TC, Niculescu FI, Soane L, Shin ML, Rus H. Molecular cloning and characterization of RGC-32, a novel gene induced by complement activation in oligodendrocytes. *J Biol Chem* 1998;273(41):26977-81.
19. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* 2000;25(1):25-9.
20. Vlaicu SI, Tegla CA, Cudrici CD, et al. Epigenetic modifications induced by RGC-32 in colon cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 2010;88(1):67-76.
21. Ioachim EE, Katsanos KH, Michael MC, Tsianos EV, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of cyclin D1, cyclin E, p21/waf1 and p27/kip1 in inflammatory bowel disease: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *International Journal of Colorectal Disease* 2004;19(4):325-33.
22. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics* 2007;8(4):286-98.
23. Fang JY, Chen YX, Lu J, et al. Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progressing in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116. *Cell Research* 2004;14(3):217-26.
24. Mitani Y, Oue N, Hamai Y, et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21(WAF1/CIP1) expression by gastric carcinoma. *The Journal of Pathology* 2005;205(1):65-73.
25. Firestein R, Blander G, Michan S, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS ONE* 2008;3(4):e2020.
26. Attema JL, Papathanasiou P, Forsberg EC, Xu J, Smale ST, Weissman IL. Epigenetic characterization of hematopoietic stem cell differentiation using miniChIP and bisulfite sequencing analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(30):12371-6.
27. Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, et al. RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest. *Oncogene* 2007;26(8):1110-21.
28. Takai N, Kawamata N, Walsh CS, et al. Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res* 2005;3(5):261-9.
29. Fosbrink M, Cudrici C, Niculescu F, et al. Overexpression of RGC-32 in colon cancer and other tumors. *Experimental and Molecular Pathology* 2005;78(2):116-22.
30. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* 2006;25(3):435-57.
31. Wotton S, Terry A, Kilbey A, et al. Gene array analysis reveals a common Runx transcriptional programme controlling cell adhesion and survival. *Oncogene* 2008;27(44):5856-66.

CURRICULUM VITAE

14 Mai 2010

Sonia Irina Vlaicu

Strada Clinicilor nr. 3-4
Clinica Medicală I,
Universitatea de Medicină și Farmacie
“Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, 400006,
Adresa de E-mail: vlaicus@yahoo.com

Domiciliu:

Strada Republicii nr. 1, ap.26,
Cluj-Napoca, 400015
România

Data nașterii:

27 Noiembrie 1978
București, România

Cetățenie:

Română

Stare civilă:

Necăsătorită

Educație și formare:

Liceu:

1994-1997

Liceul “Emil Racoviță”, Cluj-Napoca

Profil Informatică

Facultate:

9/1998-9/2004

Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”

Cluj-Napoca, Romania

Rezidențiat:

01/2005-

Specialitatea Medicină Internă

Clinica Medicală I,

Universitatea de Medicină și Farmacie

“Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

Studentă a Școlii Doctorale din
cadrul Universitatea de Medicină și

Farmacie

“Iuliu Hațieganu”:

11/2004-

Coordonator științific: Prof. Dr. Petru Mircea

Secția de Gastroenterologie,

Clinica Medicală I,

Universitatea de Medicină și Farmacie

“Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca

Titlul tezei:

“Alterări ale ciclului celular în patogeneza cancerului de colon”

Competență lingvistică:

Engleză (nivel avansat), Franceză (nivel avansat)

Deține diploma DALF (“**Diplôme Approfondi en**

Langue Française”) din anul 1998

Stagii de formare internațională:

- Stagiul de pregătire clinică la Clinica “Allgemeines Krankenhaus Universitätskliniken Wien”, Departamentul de Endocrinologie, Vienna, Austria (August 2000)
- Bursier Erasmus –stagiul de pregătire clinică în cadrul departamentului de Hemato-Onco-Pediatrie al “Centre Hospitalier Universitaire “Charles Nicole” Rouen, Franța (Mai-Iulie 2003)

Experiență în cercetare:

- Stagiul de pregătire în cercetare în cadrul proiectului: “The Analysis of Genetic Factors Involved in Diabetes Mellitus Tip 2”, la Spitalul “Joan XXIII” – Universitatea de Medicină “Rovira I Virgili”, Tarragona, Spania (Iulie 2002)
- Stagiul de cercetare în cadrul proiectului “Cytokines as predictors of flares in Systemic Lupus Erythematosus” la University of Maryland School of Medicine (SUA), Departamentul de Reumatologie, sub supervizarea Dr Violeta Rus (Septembrie-Octombrie 2003)
- Stagiul de cercetare în cadrul proiectului “The role of RGC-32 in colon carcinogenesis” (cercetare integrată în conceperea lucrării de doctorat) la University of Maryland School of Medicine (SUA), Departamentul de Medicină, sub supervizarea Dr Horea Rus (Februarie-Mai 2006, Martie-Septembrie 2007, Octombrie- Decembrie 2008)

Cursuri de formare în cercetare:

- “PGA Traveling Tutorials: Genomics in Biomedical Research” 17-18 Aprilie 2007 – curs integrat în programul “The Program in Genetics and Genomic Medicine” al University of Maryland, School of Medicine
- Seminarul “siRNA/miRNA Applications” 19 Iulie 2007, organizat de University of Maryland School of Medicine
- Cursul “Introduction to Basic Research” (Biochimie, Biologie Celulară și Moleculară, Genetică, Imunologie) – organizat de către departamentul de Medicină al University of Maryland, School of Medicine în perioada 6-17 August 2007

Subiecte de interes în cercetare:

Biologia moleculară a cancerului.
“Signal transduction” în cancerul de colon.
Gena RGC-32.

Membră a următoarelor societăți profesionale:

Societatea Română de Gastroenterologie și Hepatologie -
SRGH

Lista lucrărilor științifice publicate ca prim autor/ co-autor:

1. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, et al. Role of Response Gene to Complement 32 in diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2008;56(2):115-22.
2. Vlaicu SI, Tegla CA, Cudrici CD, et al. Epigenetic modifications induced by RGC-32 in colon cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 2010;88(1):67-76.
3. Fosbrink M, Cudrici C, Tegla CA, Soloviova K, Ito T, Vlaicu SI, et al. Response Gene to Complement 32 is required for C5b-9 induced cell cycle activation in endothelial cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2009;86:87-94.

4. Tegla CA, Cudrici C, Rus V, Ito T, Vlaicu SI, Singh A, Rus H. Neuroprotective effects of the complement terminal pathway during demyelination: Implications for oligodendrocyte survival. *Journal of Neuroimmunology* 2009;213:3–11
5. Cudrici C, Ito T, Zafranskaia E, Niculescu F, Mullern KM, Vlaicu SI, et al. Dendritic cells are abundant in non-lesional gray matter in multiple sclerosis. *Experimental and Molecular Pathology* 2007 October;83(2):198–206.
6. Vălean S, Mircea PA, Oprea L, Frentiu D, Popescu G, Nagy G, Vlaicu SI, Damian O. Trends of mortality rates from gastric cancer and colorectal cancer in Romania (1955-2003). *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2006;15(2):111-116

Lista lucrărilor științifice comunicate sau publicate în volume de rezumate:

1. Vlaicu SI, Cudrici C, Rus V, Mircea PA, Rus H. Response Gene to Complement-32 in colon tumorigenesis. Poster section –European Multidisciplinary Colorectal Cancer Congress 24-26 February 2008, Berlin, Germany (abstract available in *Annals of Oncology 2008, Volume 19, Supplem 1, p. i31*)
2. Vlaicu SI, Tegla C, Cudrici C, Rus V, Mircea PA, Rus H. Response Gene to Complement-32 regulates Histone H2B acetylation in colon cancer cells. Poster section –ESMO Conference: 11th World Congress on Gastrointestinal Cancer 24-27 June 2009: Barcelon, Spain (abstract available in *Annals of Oncology 2009, Volume 20, Supplem 7, p. vii34*)
3. Cudrici C, Niculescu F, Jansen T, Zafranskaia E, Fosbrink M, Vlaicu SI, Rus V, Shin ML, Rus H. C5b-9 Terminal Complex Protects Oligodendrocytes from Apoptotic Cell Death. 8th International Congress of Neuroimmunology October 15-19, 2006, Nagoya, Japan; ed. Medimond, Chapter 7: p.377-381
4. Vălean S, Mircea PA, Oprea L, Frentiu D, Popescu G, Nagy G, Vlaicu SI, Damian O. Trends of mortality rates from gastric cancer and colorectal cancer in Romania (1955-2003). Poster section –World Congress of Gastroenterology September 12-14, 2005, Montreal, Canada

**„IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE
AND PHARMACY OF CLUJ-NAPOCA**



***CELL CYCLE ALTERATIONS IN COLON
CANCER PATHOGENESIS***

PhD Thesis

ABSTRACT

**PhD candidate: Sonia I. Vlaicu
Scientific coordinator: Prof. dr. Petru A. Mircea**

2010

CONTENTS

INTRODUCTION	p. 4
PART I – OVERVIEW OF THE CURRENT LITERATURE	
CHAPTER 1. EPIDEMIOLOGY AND RISK FACTORS FOR COLORECTAL CANCER	
1.1 The epidemiology of colorectal cancer	p. 7
1.2 Risk factors	p. 8
1.3 Protective factors	p. 12
CHAPTER 2. THE DIAGNOSIS, STAGING AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF COLORECTAL CANCER	
2.1 The pathology of colorectal cancer	p. 15
2.2 The clinical manifestations of CRC	p. 16
2.3 The therapeutic management of CRC	p. 19
CHAPTER 3. CELL CYCLE DEREGULATION DURING TUMORIGENESIS	
3.1 The“ABC”s of cell cycle	p. 25
3.2 Cell cycle regulation	p. 26
3.3 The regulatory mechanisms of CDK expression	p. 28
3.4 Cell cycle checkpoints	p. 29
3.5 Cell cycle deregulation in human cancerogenesis	p. 32
CHAPTER 4. THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE PRE-MALIGNANT AND MALIGNANT LESIONS OF THE COLON	
4.1 The adenoma – carcinoma sequence	p. 35
4.2 The significance of the serrated polyp	p. 38
4.3 The concept of epigenetics	p. 39
4.4 The global molecular classifiers of CRC	p. 41
4.5 Colorectal carcinogenesis in inflammatory bowel diseases. Colitis-associated colorectal cancer	p. 44
CHAPTER 5. RESPONSE GENE TO COMPLEMENT (RGC)-32 – POTENTIAL CELL CYCLE REGULATOR IN COLON CANCER	
5.1 The role of RGC-32 in cellular proliferation	p. 46
5.2 RGC-32 in cancer.....	p. 47
PART 2 – ORIGINAL RESEARCH	
CHAPTER 1. INTRODUCTION	p. 50
CHAPTER 2. MATERIALS AND METHODS	p. 52
CHAPTER 3. RESULTS	p. 61
CHAPTER 4. DISCUSSION	p.95
CHAPTER 5. CONCLUSIONS	p.108
REFERENCES	p.110

INTRODUCTION

Based on comprehensive studies focusing on the genetic modifications in colon carcinogenesis, colon cancer maintains his statute of representative model for the genetic basis of cancer. Recent work, however, also describes colon cancer as a prototype for the epigenetic changes occurring during tumorigenesis.¹

First cloned by differential display in 1998 by a team conducted by Rus HG, Response Gene to Complement (RGC)-32 is involved in cell cycle control in human aortic smooth muscle cells, as it functions as both an activator and a substrate for p34CDC2.² Furthermore, the deregulation of RGC-32 expression has been detected in a large variety of human cancers.³

In this project, our aim was to outline the role of RGC-32 in colon carcinogenesis. By means of immunohistochemistry, we investigated the expression of RGC-32 in normal, precancerous and cancerous colon tissue. We then used gene array analysis to investigate the effect of RGC-32 knockdown on gene expression in the SW480 human colon adenocarcinoma cell line. The observation that a group of genes involved in chromatin assembly were the most significantly regulated genes in these cells lead us to later demonstrate the relation between RGC-32 and histone acetylation and methylation processes. We also showed that silencing RGC-32 caused a significantly higher percentage of SW480 human colon adenocarcinoma cells to enter S phase, and subsequently G2/M. Our data draw attention upon the impact of RGC-32's deregulation in colon carcinogenesis and upon its role – by inducing epigenetic alterations of histones – in chromatin assembly processes in colon cancer.

PART I – OVERVIEW OF THE CURRENT LITERATURE

CHAPTER 1. EPIDEMIOLOGY AND RISK FACTORS FOR COLORECTAL CANCER

Colorectal cancer (CRC) incidence in medium-risk patients is approximately 5%; thus, one in 18 men and one in 19 women will develop CRC in their life-time.⁴ The risk of occurrence for CRC is influenced by both genetic and environmental factors. Personal or family history of sporadic cancers or adenomatous polyps, familial adenomatous polyps, hereditary nonpolyposis colorectal cancer, inflammatory bowel disease are all recognized risk factors for colorectal cancer.⁵ A large number of studies focused on the association between obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and CRC outline the importance of the energetic balance in colon carcinogenesis.^{6,7} Red and processed meat consumption, as well as smoking and alcohol consumption are all associated with an increased risk for colorectal cancer. With regard to protective factors, we owe to mention the macronutrient group (high vegetable, fruit and fiber intake), the micronutrient group (folic acid, calcium, magnesium, vitamins D and B6) and also the drugs that can potentially serve as means of prevention for colorectal cancer.⁵

CHAPTER 2. THE DIAGNOSIS, STAGING AND THERAPEUTIC MANAGEMENT OF COLORECTAL CANCER

The diagnostic tests for CRC include total colonoscopy with biopsy sampling, double-contrast barium enema supplemented by flexible sigmoidoscopy or CT colonography. The clinical staging evaluation comprises the CT scan, contrast-enhanced MRI and the intraoperative evaluation.⁸ The Dukes classification, modified by Astler-Coller, along with the TNM system, conceived by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) are the tools currently used to estimate patient prognosis and to plan the therapeutic management.⁸ Surgery is the only curative

option for localized colon cancer, and a potentially curative option for patients with limited metastatic disease.⁹ The adjuvant therapy (5-FU, Leucovorin and Oxaliplatin) is complemented by molecular targeted therapies, already approved (human monoclonal antibodies directed against VEGF or EGFR) or in experimental stage (membrane receptors targeted agents, intracellular networking targeting agents, cell-cycle regulatory kinases targeting agents).⁸

CHAPTER 3. CELL CYCLE DEREGLANTION DURING TUMORIGENESIS

Cell cycle alterations associated with cancerogenesis can occur – through genetic mutations – at any given level of the cell cycle : CDKs, cyclins, CDK activators or inhibitors, CDK substrates or DNA damage checkpoints (G1/S, G2/M or metaphasis/anaphasis transition) proteins.¹⁰ Researchers were able to identify a vast number of proto-oncogenes and tumoral suppressor genes involved in cell cycle deregulation. Their signaling pathways tend to converge towards the G1 phase/S phase transition mechanism. The disruption of Rb-E2F and p53-governed signaling pathways constitutes a hallmark of oncogenesis.¹¹

CHAPTER 4. THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE PRE-MALIGNANT AND MALIGNANT LESIONS OF THE COLON

The colon carcinogenesis prototype described by Vogelstein and Fearon in 1990 defined colon cancer as a homogenous entity, and the colon carcinogenesis pathway – as a linear multistep sequence.¹²

A specific genetic event was assigned to each stage of the aberrant crypt foci→ adenoma→ carcinoma sequence; we describe in detailed the proto-oncogenes mutations (RAS/BRAF), as well as those of the tumour suppressor genes (the Wnt – APC – β -catenin pathway, the p53, DCC and SMAD genes).¹³ The serrated polyp represents an alternative precursor lesion (with distinct histopathological features) in colon tumorigenesis.¹⁴

Epigenetic changes involved in colon cancerogenesis (histone modification, DNA methylation, RNA interference) have become the forefront of colon cancer research. Numerous genes are silenced through promoter methylation in colorectal neoplasia: Wnt signaling pathway genes (APC, SFRP family genes), mismatch repair genes (*MGMT*, *MLH1*), cell cycle regulatory genes (CHFR, p14^{ARF}, p16), as well as genes involved in apoptosis and differentiation (GATA 4, GATA 5). Epigenetic silencing generates a favorable environment in regards to selective oncogene and tumour suppressor gene mutations, thus facilitating tumoral progression.^{1, 15, 16} The global molecular classifiers of CRC encompass chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and CpG island methylator phenotype (CIMP). There are two parallel pathways in colon tumorigenesis: one pathway (governed by genetic aberrations) defined by chromosomal instability CIN, K-RAS and APC mutations, conventional adenoma and a distal location of the tumor, another one (dominated by epigenetic changes) characterized by CpG island methylator phenotype, BRAF gene mutation, and the serrated polyp as forerunner lesion.¹

The inflammatory bowel disease carcinogenesis is not identical to sporadic colorectal cancer carcinogenesis; the distinguishing features of this model of carcinogenesis include the specific precursor lesions, the predominant type of genomic instability, the timing and frequency of oncogene or tumour suppressor gene mutations.¹⁷

CHAPTER 5. RESPONSE GENE TO COMPLEMENT (RGC)-32 – POTENTIAL CELL CYCLE REGULATOR IN COLON CANCER

First cloned by differential display by Badea et al in 1998, Response Gene to Complement (RGC)-32 was then identified as one of the genes induced by complement activation in rat

oligodendrocytes.¹⁸ RGC-32 functions as both an activator and a substrate for p34CDC2. Overexpression of RGC-32 was associated with accelerated entry of aortic smooth muscle cells in the S-phase and, subsequently, G2/M phase.² RGC-32 expression is up-regulated in colon, ovarian, breast and prostate cancers and cutaneous T cell lymphoma, data suggesting a complex role for RGC-32 in human cancers.³

PART 2 – ORIGINAL RESEARCH

CHAPTER 1. INTRODUCTION

Deregulation of cell cycle regulator genes is accountable for the uncontrolled, chaotic cellular proliferation representing the foundation of colon carcinogenesis. Numerous alterations of cell cycle regulators have already been documented in CRC. As previously reported, RGC-32 is up-regulated in colon cancer. In order to investigate the role of RGC-32 in carcinogenesis, we have now examined the expression of RGC-32 in normal colonic mucosa, precancerous states, and colon adenocarcinoma (early and advanced stages). Using gene array analyses, we identified the genes that were differentially regulated in SW480 human colon adenocarcinoma cells in which RGC-32 expression had been silenced. We then investigated the association between RGC-32 knock-down and epigenetic modifications such as histone acetylation and methylation processes. In order to ascertain the role of RGC-32 in colon adenocarcinoma cell cycle regulation, we assessed the effect of RGC-32 silencing upon cell cycle phases progression.

CHAPTER 2. MATERIALS AND METHODS

Indirect immunoperoxidase staining for RGC-32 was performed on several tissue array slides, purchased from specialized companies, and on paraffin embedded samples obtained during colonoscopy performed in the Gastroenterology Department, Medical Clinic I. We used the shRNA RGC-32 and shCTR expression plasmids and the SW80 human colon adenocarcinoma cell line for the transfection experiments. We quantified the expression of several genes of interest by means of Real-time PCR. Gene expression profiling in colon cancer was assessed by means of TissueScan Tissue qPCR array analysis. Oligonucleotide expression-array analysis was performed using an OHU16K Human 16K 70-mer oligonucleotide cancer array. The OHU16k microarray comprises 16,766 genes and was printed at the Yale University Keck Microarray Center (New Haven, CT). Protein expression was assessed through Western Blotting technique. DNA synthesis in SW480 colon adenocarcinoma cells was evaluated through Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assays, and DNA content –by using 7-aminoactino-mycin D.

CHAPTER 3. RESULTS

Expression of RGC-32 in normal colon, colon precancerous states, and colon cancer

Quantitative real-time PCR

To investigate the expression of RGC-32 in various stages of colon cancer, we used quantitative real-time PCR and a TissueScan colon cancer cDNA panel for disease gene expression (Origene). Our results showed a lower level of RGC-32 expression in stage I cancer than in stages II-IV. Quantitative real-time PCR analysis also revealed that mRNA levels of RGC-32 in stage II were significantly higher than those in stage I colon cancer ($p=0.0301$, Student t test). However, similar levels of mRNA expression were found in stages III and IV which did not differ significantly from those in stage II adenocarcinoma.

Immunohistochemical staining

Weak RGC-32 expression was seen in normal colon mucosa and small adenomas. The expression of RGC-32 in normal mucosa was mostly confined to the mesenchymal cells in the interstitial space. We made the interesting observation that only 67% of the normal colonic mucosa samples were positive for RGC-32, whereas 100% of the normal mucosa samples from colons resected from colorectal adenocarcinoma cases were positive. Most of the large adenomas expressed RGC-32, and their level of staining was more intense than that of the small adenomas. High-intensity staining was observed in 43% of the large adenomas, as compared to only 11% of the small adenomas. Furthermore, staining intensity of RGC-32 in large adenomas was statistically different from the staining intensity found in normal colonic mucosa ($p=0.02$, Fisher's exact test).

In colon adenocarcinomas, two major patterns of RGC-32 immunoreactivity were seen. In some tumors, staining was seen only in the malignant epithelial cells; in other tumors, RGC-32 reactivity was seen in both the malignant epithelium and in cells in the interstitium. RGC-32 was localized to the cytoplasm in most of the samples examined. Rarely, RGC-32 staining was seen in the nuclei in the case of some patients with colon adenocarcinomas. The proportion of RGC-32 positive adenocarcinoma samples was statistically different from adenomas ($p=0.002$, Fisher's exact test) and from normal colonic mucosa ($p=0.0001$, Fisher's exact test). The intensity of the RGC-32 staining tended to correlate with the TNM stage of the malignant tumors: 21% of the early-stage colon adenocarcinoma (T1/T2), 45% of the advanced stage adenocarcinoma (T3/T4), 43% of the tumors with lymph node metastasis and 57% of the colon adenocarcinomas with metastases to distant sites were highly positive for RGC-32. However, these differences did not reach statistical significance.

Since longstanding inflammatory bowel disease (IBD) is associated with an increased risk of colon cancer we also investigated the expression of RGC-32 in ulcerative colitis and Crohn's diseases. We found that 12 out of 13 samples from patients with ulcerative colitis or Crohn's disease were positive for RGC-32. The staining intensity in IBDs was statistically significant when compared with adenocarcinomas ($p=0.046$, Fisher's exact test).

Effect of RGC-32 knockdown on gene expression in SW480 colon cancer cells

To investigate the effect of RGC-32 knockdown on the transcription profile in the SW480 human colon cancer cell line, we used a cancer oligonucleotide array. Gene silencing in SW480 cells was successful, yielding a 90% reduction in RGC-32 mRNA expression, as quantified by real-time PCR, and a 90% reduction in RGC-32 protein expression (as assessed by Western blotting) in shRGC-32-transfected cells when compared to control shCTR-transfected cells.

Knockdown of the RGC-32 gene in SW480 cells had a significant effect on the transcriptional profile. When we restricted the profile to those genes with a ≥ 1.5 -fold change in expression, we found that 230 genes were differentially regulated in SW480 lacking RGC-32 expression, as compared to the shCTR-transfected cells. According to the microarray analysis, the most highly up-regulated genes were WEE1 (up-regulated 9-fold), RAD51 associated protein 1 (up-regulated 7.5-fold), U6 snRNA-associated Sm-like protein gene (up-regulated 4.2-fold) and histone H2B family member G (up-regulated 3.1 fold). There were 51 down-regulated genes that showed a >1.5 -fold change in expression following RGC-32 knockdown in SW480 cells: phosphodiesterase 6D cGMP-specific, delta subunit (down-regulated 55-fold), surfactant pulmonary-associated protein A2 (down-regulated 4.5 fold), metallothionein 1G (down-regulated 2.6 fold), and β -catenin (down-regulated 2.4 fold).

The differentially regulated genes were further characterized according to their roles in biological processes, using the Gene Ontology (GO).¹⁹ This analysis outlined several major functions for the genes that were differentially regulated following RGC-32 knockdown: chromatin assembly, protein DNA complex assembly, RNA processing, and cell cycle processes. The

chromatin assembly GO category included histone 2B family members, nucleosome assembly protein 1, and pyrroline 5 carboxylate reductase 1. Cell cycle-associated genes WEE1, CDC20, 14-3-3 Gamma, Prohibitin, Septin 9, C-MYC and cell division cycle CDC25B were all increased after RGC-32 knockdown.

Real-time PCR analysis

The differential expression of several of the genes that we had identified by microarray analysis was then confirmed by real-time PCR. The differentially regulated genes included WEE1, RAD51 associated protein 1, β -catenin and histone H2BD, which showed the highest level of regulation by microarray analysis. There was good agreement between the real-time PCR and microarray data. The results of the RT-PCR analysis and microarray quantification were in agreement in terms of the direction of the change, but the magnitude of the change was not always identical. To determine whether RGC-32 silencing has an impact on these genes, we examined their mRNA expression after RGC-32 silencing. p53 mRNA levels were increased after silencing of RGC-32, whereas those of CDH1, p21 and β -catenin were decreased.

Effect of RGC-32 silencing on histone modifications

Because of the significant changes in the histone H2B family members that occurred after RGC-32 knockdown, we focused our attention on this family of genes. The change in the expression of histone H2B led us to ask whether the acetylation and methylation of histones were significantly affected by RGC-32 knockdown.

To answer this question, we used Western blot analysis to detect the expression of histone and the acetylated forms of histones H2A, H2B, H3, and H4. Histone modifications were expressed as a ratio to actin and to total histone. An increase of >1.5-fold in histones modifications and expression of the HDACs was considered significant. We saw significant increases in the amount of acetylation of histone H2B at K5 and K15, histone H3 at K9 and K18, and histone H4 at K8 after RGC-32 knockdown. In contrast, the acetylation of histone H2A at K9 was not significantly affected by RGC-32 silencing. In addition, RGC-32 knockdown reduced the expression of the histone deacetylase SIRT1 and of H3K27me3. These data suggest that RGC-32 induces epigenetic changes that might be responsible for some of its effects, including those on the cell cycle.

Effect of RGC-32 knockdown on the cell cycle

We used BrdU incorporation assays and flow cytometry to determine the effect of RGC-32 knockdown on the cell cycle in SW480 cells. RGC-32 shRNA and CTR shRNA were transiently transfected into SW480 human colon adenocarcinoma cells, and the cells were synchronized in G0/G1 by starvation for 18 h. The cells were then changed to medium containing 10% FBS for 18 h and pulsed with BrdU for 1 h. The percentage of SW480 cells in the G0/G1 phase after RGC-32 knockdown was significantly reduced when compared to that of control shCTR-transfected cells (67.07% versus 73.67%, difference=6.6%, $p=0.024$, Student *t* test); the number of cells entering S phase (13.06% versus 9.66%, difference=3.4%, $p=0.046$, Student *t* test) and G2/M phase (19.87% versus 16.66%, difference=3.2%, $p=0.009$, Student *t* test) was significantly higher for the RGC-32-silenced cells than for the shCTR-transfected cells.

CHAPTER 4. DISCUSSION

In the present study, the significantly higher proportion of adenocarcinomas and adenomas that display RGC-32 staining compared to normal colonic tissue suggests a possible role for RGC-32 deregulation in colon carcinogenesis.²⁰ The percentage of ulcerative colitis and Crohn's disease samples that stained intensely for RGC-32 in our study was higher than that for normal mucosa and small adenomas, a finding that may indicate that RGC-32 expression is correlated with proliferative activity in inflammatory bowel disease and contributes to IBD-related dysplasia-carcinoma. Ioachim and colab reported a similar pattern of staining for cyclin D, cyclin E and CDK inhibitor

p21; their expression was found to be higher in the colonic mucosa sampled from IBD-patients than in normal mucosa samples, and was correlated with cell proliferation and with the presence of dysplastic lesions in these patients.²¹

To date, the components of the network of proteins regulated by RGC-32 and their role(s) in tumorigenesis are not well known. To explore this issue, we took a genomic approach using gene profiling to identify genes that are differentially expressed after RGC-32 silencing. To our knowledge, this is the first transcriptome analysis performed in tumor cell lines to assess the effect of RGC-32 silencing. In the present study, we have shown that RGC-32 has a significant impact on transcriptional regulation in the SW480 human colon adenocarcinoma cell line.²⁰ GO data mining further indicated that genes involved in chromosomal assembly were the most significantly regulated by RGC-32, a surprising result that led us to investigate the effect of RGC-32 silencing on histone modifications. These experiments indicated that RGC-32 plays an important role in regulating the acetylation of histones, a process that might in turn lead to transcriptional activation and thereby support the hypothesis that epigenetic alterations controlled by RGC-32 are involved in the regulation of the cell cycle in tumor cells.

Modification of histones can affect the degree to which DNA is compacted, and therefore its availability for use by transcription factors.²² The histone deacetylase inhibitors sodium butyrate and trichostatin (TSA) have been used to produce hyperacetylation of histone H3 and H4 in Colo-320 and SW1116 colon cancer cell lines, which was shown to lead to the re-expression of the cell cycle inhibitor p21 and G1-phase cell cycle arrest.²³ In gastric carcinoma tissue, histone H3 has been shown to be hypoacetylated in the p21 promoter region and to be associated with a reduction in p21 expression.²⁴ All these data point to the potential induction of p21 expression in colon cancer cell lines after histone hyperacetylation. In contrast, our data have shown a significant decrease in the expression of p21 and another tumor suppressor gene, CDH1, after RGC-32 silencing.²⁰

In addition, we found that RGC-32 silencing was associated with a reduction in SIRT1 and H3K27 trimethylation.²⁰ The reduction in the expression of the class III histone deacetylase SIRT1 that we observed was in agreement with the increased acetylation of histones seen after RGC-32 silencing. It is possible that the increase in acetylation that we describe is secondary to the reduction of SIRT1 expression, and it is important to point out that SIRT1 is known to suppress colon cancer growth in an β -catenin-driven model of mouse colon cancer.²⁵ H3K27me3 is typically associated with transcriptionally silent genes, and a reduction in the methylation of H3K27, as observed here, might also account at least in part for the concomitant activation of the cell cycle.²⁶

Thus, our data suggest that a high level of RGC-32 expression may favor deacetylation of histones, probably via an increase in the expression of histone deacetylases and H3K27 trimethylation, with an end result of chromatin condensation and gene silencing.

We found that knocking down RGC-32 expression produced a modest but statistically significant increase in cell cycle progression in SW480 colon cancer cells. Overexpression of RGC-32 has been shown to delay mitotic progression in HeLa cells, and immunocytochemical analysis has indicated that the RGC-32 protein is concentrated in the centrosomes and spindle poles during mitosis²⁷. RGC-32 has also been found to belong to a group of new candidate tumor suppressor genes that are epigenetically silenced in endometrial cancer cell lines and can be upregulated after treatment with a demethylating agent (5-aza-2'-deoxycytidine) and a histone deacetylase inhibitor (suberoylanilide bishydroxamide).²⁸ Since RGC-32 can induce the cell cycle in primary non-neoplastic cells^{2, 18, 29}, it is possible that this protein plays a dual role: as an activator of the cell cycle in primary cells, and as a tumor suppressor in cancer cells. It is conceivable that different tissue types, different potential ligands and the levels and activity of RGC-32 could either drive cells towards an accelerated proliferative state or, in contrast, towards mitotic arrest. Such dual

roles have been reported for other factors such as TGF- β and RUNX1.^{30, 31} RGC-32 expression can be induced by TGF- β ³; thus, the cytostatic effect induced by TGF- β in colon carcinogenesis is in agreement with the cell cycle inhibitory effect driven by RGC-32 in colon cancer cells.

CHAPTER 5. CONCLUSIONS

Our immunohistochemistry data, revealing a progression in RGC-32 staining intensity from normal colonic mucosa to colon adenomas and adenocarcinomas, indicate a possible role for RGC-32 deregulation in colon tumorigenesis. We report here the results of the first transcriptome analysis performed in tumor cell lines to assess the effect of RGC-32 silencing. Knocking-down RGC-32 expression has a significant impact on transcriptional regulation in the SW480 human colon adenocarcinoma cell line. Among the genes most significantly regulated by RGC-32 we found genes with critical functions in regard to cellular division: genes involved in chromatin assembly, DNA complex assembly, cell cycle control and RNA processing. Silencing RGC-32 is associated with an increase in histone H2B, H3 and H4 acetylation, as well as with a decrease in histone deacetylase SIRT1 and H3K27me3 expression. Our data suggest that RGC-32 plays an important role in inducing epigenetic alterations of histones and may be involved in development of colon carcinogenesis by regulating chromatin assembly. RGC-32 plays an active part in cell cycle regulation in colon cancer cells SW480, seeing as RGC-32 silencing accelerates S phase and G2/M phase entry in SW480 cells. RGC-32 protein could potentially perform dual functions: cell cycle activator in primary cells, and tumor suppressor in cancer cells, depending on the histopathological features of the tissue, on RGC-32's level and activity and on the interactions with various ligands. Further research studies are needed to fully characterize the functions this gene. An RGC-32 knockout mouse (*work in progress*) will provide valuable data in this regard. Considering the involvement of RGC-32 in colon tumorigenesis, these findings could contribute to the development of oncological and/or gastroenterological therapies.

REFERENCES

1. Wong JJ, Hawkins NJ, Ward RL. Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut* 2007;56(1):140-8.
2. Badea T, Niculescu F, Soane L, et al. RGC-32 increases p34CDC2 kinase activity and entry of aortic smooth muscle cells into S-phase. *J Biol Chem* 2002;277(1):502-8.
3. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, et al. Role of response gene to complement 32 in diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2008;56(2):115-22.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 2008;58(2):71-96.
5. Ahnen D, Macrae F. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. In: *UpToDate Online version 17.3*; 2010.
6. Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *The Journal of Nutrition* 2001;131(11 Suppl):3109S-20S.
7. Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *The American journal of Clinical Nutrition* 2007;86(3):s836-42.
8. Ahnen D, Macrae F. Clinical manifestations, diagnosis, and staging of colorectal cancer. In: *UpToDate Online version 17.3*; 2010.
9. Rodriguez-Bigas M. Surgical management of primary colorectal cancer. In: *UpToDate Online version 17.3*; 2010.
10. Laiho M, Latonen L. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. *Annals of medicine* 2003;35(6):391-7.
11. Malumbres M, Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle Research* 2003;5:5-18.
12. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759-67.
13. Calvert P, Frucht H. Molecular genetics of colorectal cancer. In: *UpToDate Online version 17.3*; 2010.
14. Jass JR, Talbot IC. Molecular and cellular biology of pre-malignancy in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2001;15(2):175-89.
15. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer* 2006;6(2):107-16.
16. Grønbaek K. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007;115(10):1039-59.

17. Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2009;6(5):297-305.
18. Badea TC, Niculescu FI, Soane L, Shin ML, Rus H. Molecular cloning and characterization of RGC-32, a novel gene induced by complement activation in oligodendrocytes. *J Biol Chem* 1998;273(41):26977-81.
19. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* 2000;25(1):25-9.
20. Vlaicu SI, Tegla CA, Cudrici CD, et al. Epigenetic modifications induced by RGC-32 in colon cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 2010;88(1):67-76.
21. Ioachim EE, Katsanos KH, Michael MC, Tsianos EV, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of cyclin D1, cyclin E, p21/waf1 and p27/kip1 in inflammatory bowel disease: correlation with other cell-cycle-related proteins (Rb, p53, ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *International Journal of Colorectal Disease* 2004;19(4):325-33.
22. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics* 2007;8(4):286-98.
23. Fang JY, Chen YX, Lu J, et al. Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progressing in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116. *Cell Research* 2004;14(3):217-26.
24. Mitani Y, Oue N, Hamai Y, et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21(WAF1/CIP1) expression by gastric carcinoma. *The Journal of Pathology* 2005;205(1):65-73.
25. Firestein R, Blander G, Michan S, et al. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS ONE* 2008;3(4):e2020.
26. Attama JL, Papathanasiou P, Forsberg EC, Xu J, Smale ST, Weissman IL. Epigenetic characterization of hematopoietic stem cell differentiation using miniChIP and bisulfite sequencing analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(30):12371-6.
27. Saigusa K, Imoto I, Tanikawa C, et al. RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest. *Oncogene* 2007;26(8):1110-21.
28. Takai N, Kawamata N, Walsh CS, et al. Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer. *Mol Cancer Res* 2005;3(5):261-9.
29. Fosbrink M, Cudrici C, Niculescu F, et al. Overexpression of RGC-32 in colon cancer and other tumors. *Experimental and Molecular Pathology* 2005;78(2):116-22.
30. Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* 2006;25(3):435-57.
31. Wotton S, Terry A, Kilbey A, et al. Gene array analysis reveals a common Runx transcriptional programme controlling cell adhesion and survival. *Oncogene* 2008;27(44):5856-66.

CURRICULUM VITAE

May 14, 2010

Sonia Irina Vlaicu, MD, PhD student

Medical Clinic 1, nr.3-4 Clinicilor Street,
“Iuliu Hatieganu” University of Medicine
and Pharmacy, Cluj-Napoca, 400006, Romania
E-mail Address: vlaicus@yahoo.com

Home address:

1, Republicii Street, app.26,
Cluj-Napoca, 400015, Romania

Born:

November 27, 1978, Bucharest, Romania

Citizenship:

Romanian

Marital Status:

Single

Education:

High School:
1994-1997

“Emil Racoviță” High school, Cluj-Napoca

Medical School:
9/1998-9/2004

“Iuliu Hatieganu” University of Medicine
and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania

Internship:
01/2005-01/2006

Internal Medicine
Medical Clinic 1,
“Iuliu Hațieganu” University of Medicine
and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania

Residency:
01/2006-

Internal Medicine
Medical Clinic 1,
“Iuliu Hațieganu” University of Medicine
and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania

Ph.D. student since:
11/2004-

Scientific Coordinator: Petru Mircea,
Division of Gastroenterology,
Medical Clinic 1
“Iuliu Hațieganu” University of Medicine
and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
Ph.D. subject:
“Cell cycle alterations in colon cancer pathogenesis”

Foreign language skills:

fluent in English and French; obtained the official French
language diploma - “**Diplôme Approfondi en Langue
Française (DALF)**” in 1998

International Clerkships:

- Summer clerkship at “Allgemeines Krankenhaus Universitätskliniken Wien” Clinic, Division of Endocrinology, Vienna, Austria (August 2000)
- Erasmus scholarship in “Centre Hospitalier Universitaire “Charles Nicole”” at Rouen, France, Division of Hemato-Onco-Pediatrics (May-July 2003)

Research experience:

- Research clerkship at “Joan XXIII” Hospital – “Rovira I Virgili” University of Medicine, Tarragona, Spain, for the project: “The Analysis of Genetic Factors Involved in Diabetes Mellitus Tip 2” (July 2002)
- Research elective “Cytokines as predictors of flares in Systemic Lupus Erythematosus” at the University of Maryland School of Medicine, Department of Rheumatology, under Dr Violeta Rus’s supervision, (September-October 2003)
- Research scholar “The role of RGC-32 in colon carcinogenesis” (PhD thesis research) at the University of Maryland School of Medicine, Department of Medicine, under Dr Horea Rus’s supervision (February-May 2006, March-September 2007, October- December 2008)

Research training courses:

- PGA Traveling Tutorials: Genomics in Biomedical Research April 17-18, 2007 - part of The Program in Genetics and Genomic Medicine conducted at University of Maryland, School of Medicine
- siRNA/miRNA Applications Seminar July 19, 2007, University of Maryland, School of Medicine
- Introduction to Basic Research Course (Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, Genetics, Immunology) –organized by the department of Medicine University of Maryland, School of Medicine, August 6-17, 2007

Major Research Interests:

Molecular Biology of Cancer.
Signal Transduction in Colon Cancer.
RGC-32 gene.

Professional Membership:

Romanian Gastroenterology & Hepatology Society
(Societatea Română de Gastroenterologie și Hepatologie - SRGH).

Refereed Publications:

7. Vlaicu SI, Cudrici C, Ito T, et al. Role of Response Gene to Complement 32 in diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2008;56(2):115-22.
8. Vlaicu SI, Tegla CA, Cudrici CD, et al. Epigenetic modifications induced by RGC-32 in colon cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 2010;88(1):67-76.
9. Fosbrink M, Cudrici C, Tegla CA, Soloviova K, Ito T, Vlaicu SI, et al. Response Gene to Complement 32 is required for C5b-9 induced cell cycle activation in endothelial cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2009;86:87-94.

10. Tegla CA, Cudrici C, Rus V, Ito T, Vlaicu SI, Singh A, Rus H. Neuroprotective effects of the complement terminal pathway during demyelination: Implications for oligodendrocyte survival. *Journal of Neuroimmunology* 2009;213:3–11
11. Cudrici C, Ito T, Zafranskaia E, Niculescu F, Mullern KM, Vlaicu SI, et al. Dendritic cells are abundant in non-lesional gray matter in multiple sclerosis. *Experimental and Molecular Pathology* 2007 October;83(2):198–206.
12. Vălean S, Mircea PA, Oprea L, Frentiu D, Popescu G, Nagy G, Vlaicu SI, Damian O. Trends of mortality rates from gastric cancer and colorectal cancer in Romania (1955-2003). *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 2006;15(2):111-116

Scientific works published as abstracts or communications:

5. Vlaicu SI, Cudrici C, Rus V, Mircea PA, Rus H. Response Gene to Complement-32 in colon tumorigenesis. Poster section –European Multidisciplinary Colorectal Cancer Congress 24-26 February 2008, Berlin, Germany (abstract available in *Annals of Oncology* 2008, Volume 19, Supplem 1, p. i31)
6. Vlaicu SI, Tegla C, Cudrici C, Rus V, Mircea PA, Rus H. Response Gene to Complement-32 regulates Histone H2B acetylation in colon cancer cells. Poster section –ESMO Conference: 11th World Congress on Gastrointestinal Cancer 24-27 June 2009: Barcelon, Spain (abstract available in *Annals of Oncology* 2009, Volume 20, Supplem 7, p. vii34)
7. Cudrici C, Niculescu F, Jansen T, Zafranskaia E, Fosbrink M, Vlaicu SI, Rus V, Shin ML, Rus H. C5b-9 Terminal Complex Protects Oligodendrocytes from Apoptotic Cell Death. 8th International Congress of Neuroimmunology October 15-19, 2006, Nagoya, Japan; ed. Medimond, Chapter 7: p.377-381
8. Vălean S, Mircea PA, Oprea L, Frentiu D, Popescu G, Nagy G, Vlaicu SI, Damian O. Trends of mortality rates from gastric cancer and colorectal cancer in Romania (1955-2003). Poster section –World Congress of Gastroenterology September 12-14, 2005, Montreal, Canada