

TEZA DE ABILITARE

Daniel Coriu

REZUMAT

Aceasta teza de abilitare are drept obiectiv demonstrarea maturitatii stiintifice a aplicantului, necesara pozitiei de profesor universitar si conducator de doctorat in domeniul Hematologiei Clinice.

Teza de abilitare are doua parti: prima parte care arata contributia stiintifica originala a aplicantului in domeniul hematologiei; a doua parte - propuneri de dezvoltarea a carierei academice.

1. Contributia stiintifica originala a aplicantului in domeniul hematologiei

1.1 Identificarea bazele moleculare ale mielomului multiplu non- secretor.

Acest studiu identifica, pentru prima data, cauza non exportului celular al proteinei monoclonale in mielomul multiplu non – secretor: prezenta unui lant usor K anormal care rezulta dintr-un frameshift al secventei nucleotidice din regiunea constanta a molecule. Prin deletia a doua baze din codonul 187 si pierderea codonului stop normal are loc un frameshift – rezulta o proteina aberanta cu 128 aminoacizi (normal 106 aa) si disparitia cisteinei la pozitia 187, absolut necesara pentru legaturile disulfidice dintre lanturi, respectiv legaturile disulfidice din structura lantului. Aceasta structura primara neobisnuita a lantului usor K a fost confirmata prin mass spectrometrie si analiza amino acizilor din structura primara a proteinei extrase din citoplasma celulelor mielomatoase.

1.2. Bazele moleculare ale amiloidozei ereditare.

1.2.1. Amiloidoza ereditara tip Apolipoproteina A- I – Amiloidoza Hepatica determinata de depunerea variantei Leu75Pro de apolipoprotein A-I

In acest studiu descriem un tip de amiloidoza ereditara cu afectare predominant hepatica determinat de o noua varianta de Apolipoprotein A-I (AApo A-I) rezultata din substitutia leucinei cu prolina la pozitia 75 (Leu75Pro). Secventierea exonului 4 din gena Apo A-I indica inlocuirea thyminei (T) cu cytozina (C) in a doua baza codonului 75. In plus, secventializarea fibrilelor de amiloid extrase din ficat au aratat ca acestea sunt formate aproape exclusiv din fragmentul N- terminal (96 aminoacizi) al moleculei Apo A-I care contine varianta Leu75Pro. Foarte interesant - in plasma se identifica varianta aberanta de Apo A-I sub 10%, restul este reprezentat de forma normala (wild-type), adica exact proportia inversa fata de

depozitele de amiloid din ficat, unde gasim predominant forma mutanta. Aceasta se atribuie instabilitatii proteinei aberante, comparativ cu forma nativa.

1.2.2. Amiloidoza ereditara tip Transthyretin - O noua varianta de transthyretin Glu54Gln asociata cu amiloidoza familiala

Amiloidoza tip Transthyretin (TTR) este cea mai intalnita forma de amiloidoza ereditara sistemica determinate de mutatii la nivelul genei TTR. In acest studiu noi am identificat o varianta de TTR Glu54Gln, nedescrisa anterior si specifica populatiei din Romania. Secventierea genei TTR (4 exoni) a identificat inlocuirea G cu C in prima pozitie a codonului 54 (GAG -> CAG) care duce la un status heterozigot pentru mutatia Glu54Gln in exonul 3 al genei TTR. Aceasta mutatie a fost confirmata de analiza RFLP. Analiza de mass spectrometrie a molecule de TTR separat din ser prin imunoprecipitare nu arata modificari de masa moleculara intre acesta noua varianta si TTR wild type.

1.2.3. Amiloidoza ereditara tip lizozim - Amiloidoza ereditara sistemica determinata de o noua varianta de lizozim (D67G) intr-o familie din Romania

Pana la acest moment au fost identificate patru variante de lizozim capabile sa determine amiloidoza tip lizozim (I56T, D67H, W64R, F57I). In aceasta lucrare noi raportam un tip nou lizozim D67G specific populatiei din Romania. Analiza secventei nucleotidice arata tranzitia GAT la GGT in codonul 85 al exonului 2, aceasta duce la inlocuirea acidului aspartic cu glicina la pozitia 67. Studiile de cristalografie cu raze X arata ca aceasta mutatie destabilizeaza molecula de lizozim care devine amiloidogenica.

1.2.4. Demonstrarea rolului pe care amiloidul il are in procesul de imbatranirea tisulara- Amiloidul continut in meniscul articulatiei genunchiului este format din amiloid.

Aceasta lucrare demonstreaza natura amiloidului gasit in meniscul articulatiei genunchiului. Folosind secventierea proteinei si mass spectrometria am demonstrat ca acest amyloid este tip Apo A I. Analiza Southern blot si RT-PCR au aratat ca sursa precursorului de amyloid este chondrocitul. Acest tip nou de amyloid wild type reprezinta o forma de amiloidoza localizata aparuta in procesul fiziologic de imbatranire tisulara.

1.3. Bazele moleculare in leucemiile acute - O nouă metodă de identificare a mutațiilor recurente în leucemia acută mieloblastică folosind secvențierea de nouă generație

În acest articol descriem o nouă metodă de identificare a mutațiilor în 5 gene implicate în LAM: RUNX1, FLT3, DNMT3A, IDH1 și IDH2 utilizând secvențierea de nouă generație - platforma MiSeq de la Illumina / LaserGene Genomics suit. Din punct de vedere clinic identificarea mutațiilor în aceste cinci gene este foarte importantă deoarece mutațiile în DNMT3A, FLT3 și RUNX1 au un prognostic nefavorabil, iar mutațiile în IDH1 și IDH2 au un prognostic pozitiv. Nu au fost identificate mutații adiționale în probele de la nouă pacienți pozitivi pentru mutațiile FLT3-ITD și / sau NPM1. În probele de la 25 din 31 de pacienți, cu cariotip normal și fără mutații FLT3-ITD și NPM1, au fost identificate mutații în una din cele 5 gene studiate. Aceasta nouă metodă a permis identificarea a trei mutații noi:

- mutația K906E în DNMT3A, este o mutație identificată pentru prima dată,
- mutația R201X and R204X în RUNX1. Acestea sunt mutații neobisnuite rezultând proteine cu alterare structurală și conformatională. Toate aceste mutații identificate prin secvențierea de nouă generație, au fost confirmate prin metoda de secvențiere clasică Sanger.

Alte rezultate importante:

- realizarea și implementarea în România a diagnosticului molecular în alfa și beta talasemie
- realizarea în România a primului diagnostic molecular prenatal în beta talasemie
- realizarea și implementarea în România a diagnosticului molecular în leucemii
- realizarea și implementarea în România a diagnosticului molecular standardizat (Real Time PCR) în leucemia mieloidă cronică
- realizarea și implementarea în România a metodelor de identificarea a mutațiilor în domeniu ABL Kinazic în leucemia mieloidă cronică.

2. Propuneri de dezvoltarea a carierei academice

Toată activitatea mea în domeniul de medical și al cercetării științifice este marcată de experiența câștigată în perioada petrecută (Aprilie 2000 – Martie 2002 și apoi Iulie – Octombrie 2004) în Statele Unite, Knoxville, TN. Aici am avut șansa să îl am ca mentor pe dl Prof Alan Solomon, un cercetător strălucit în domeniul mielomului multiplu și al amiloidozei. În aceste laboratoare am învățat să folosesc instrumentele esențiale ale cercetării moderne (proteomica și genomica), dar poate mai important, am înțeles cum funcționează sistemul medical și sistemul de cercetare științifică în USA.

Dupa intoarcerea din Statele Unite am reusit, impreuna cu echipa de la Institutul Clinic Fundeni, Centrul de Hematologie si Transplant Medular Adulti si Copii, sa realizam o platforma care include laboratoarele de: Citologie si Citochimie, Hemopatologie, Hemostaza, Citogenetica si FISH, Culturi Celulare, Proteinologie si Hemoglobinopatii, Biologie Moleculara, Citometrie in Flux. Aceasta platforma de cercetare, diagnostic si monitorizare a bolilor hematologie este unica in Romania prin complexitatea ei, supraspecializarea personalului si calitatea echipamentelor existente. **Resursele Financiare** au fost obtinute prin castigarea de contracte / granturi nationale (a se vedea lista anexata) si sponsorizari directe. **Personal Supraspecializat** a fost pregatit prin stagii in Genova (Italia), Mannheim (Germania), Atena (Grecia), Nicosia (Cipru), Ierusalim (Israel), Munich (Germania), Birmingham (UK). **Verificarea si validarea** activitatii noastre prin control extern, in parteneriat international cu centre similare din Statele Unite si Europa.

Cercetare in domeniul biologiei moleculare si studiul proteinelor in domeniul sindroamelor talasemice, mielomului multiplu, amiloidoza ereditara si amiloidoza primara, leucemia mieloida cronica, leucemii acute. Biologia celulelor stem hematopoietice (aplicatii in transplantul medular).

Cercetare clinica: in domeniul mielomului multiplu, amiloidozei primare, leucemiilor, limfoamelor maligne si altor boli hematologice.

Studii Clinice: Investigator Principal – 5; subinvestigator 1.

Proiecte de cercetare: Am fost director in 6 proiecte nationale, responsabil partener in 2 proiecte nationale, si 4 proiecte internationale (a se vedea CV-ul).

In acest moment in Centrul de Hematologie si Transplant Medular Fundeni exista infrastructura si premisele necesare pentru dezvoltarea cercetarii stiintifice in domeniul hematologiei. Acest proces este facilitat de parteneriatele deja existente cu centre de cercetare recunoscute.

O atentie deosebita trebuie acordata:

- managementului financiar: identificare surselor de finantare din programele nationale de sanatate, din programe nationale si internationale de cercetare
- managementului resurselor umane: angajarea de persoane competente, pregatirea continua a personalului, atragerea tinerilor in activitatea de cercetare, recunoasterea si promovarea valorilor.