

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Noi strategii în terapia cancerului prin aplicarea analizelor de genomica funcțională

Student doctorand **Valentina Pileczki**

Conducator științific **Prof. Dr. Robert Săndulescu**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

INTRODUCERE	19
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	21
1. Particularități ale celulelor tumorale maligne	23
2. ARN-urile necodificatoare în biologia cancerului	31
2.1. Mecanismele și funcțiile ARN-urilor lungi necodificatoare în cancer	31
2.2. Regiuni ultranonservate transcrise în cancerele umane	33
2.3. Biogeneza și funcția microARN-urilor	34
2.4. ARN-ul de interferență	35
2.4.1. Moleculele siRNA în mecanismele ARN-ului de interferență	35
2.4.2. Planificarea etapelor experimentale și selecția de siARN-uri funcționale	36
2.4.3. Problemele majore care pot fi întâlnite în terapia cu siARN	37
2.4.4. Sisteme de livrare ale siARN	38
2.4.5. Nanoparticule lipozomale în transfecția celulelor cu siARN	39
3. Compuși naturali în cancer	41
3.1. Beneficiile Epigallocatechin gallate	42
3.2. Beneficiile Genisteinei	42
Contribuții personale	45
1. Ipoteza de lucru / Obiective	47
2. Studiu 1: Influențele rezecției transuretrale a tumorilor de vezică urinară asupra calității acizilor nucleici	49
2.1. Introducere	49
2.3. Materiale și metode	50
2.3.1. Pacienți	50
2.3.2. Colectarea probelor, procesarea și extracția de acizi nucleici	51
2.3.3. Evaluarea ARN-ului	52
2.3.4. Evaluarea Quantitative Real Time PCR a moleculelor de ARN mesager	52
2.3.5. Evaluarea Quantitative Real Time PCR a moleculelor de micro ARN	53
2.4. Rezultate	53
2.4.1. Evaluarea cuantitativă a probelor de ARN total	53

2.4.2. Evaluarea calitativă a probelor de ARN total	53
2.4.3. Evaluarea micro ARN-urilor	55
2.4.4. Evaluarea expresiei genice	55
2.4.5. Corelații între analiza genică, cea a micro ARN-uri și parametrii obținuți prin analiza calitativă	56
2.5. Discuții	57
2.6. Concluzii	60
3. Studiul 2: Inhibarea concomitentă a genelor p53 mutantă și TNF în cancerul mamar triplu negativ	63
3.1. Introducere	63
3.2. Ipoteza de lucru	64
3.3. Materiale și metode	64
3.3.1. Linii celulare	64
3.3.2. Parametrii utilizați pentru efectuarea transfecției	65
3.3.3. Evaluarea viabilității celulare prin testul MTT	66
3.3.4. Marcarea celulelor cu Anexină V-FITC și TMRE	66
3.3.5. Evaluarea inducerii autofagiei și a citotoxicității celulare	66
3.3.6. Evaluarea expresiei genice prin tehnica de RT-PCR array	67
3.3.7. Evaluarea expresiei genice prin TaqMan RT-PCR	67
3.3.8. Analiza proteică prin western blot	68
3.4. Rezultate	68
3.4.1. Inhibarea concomitentă a genelor p53 și TNF induce apoptoza liniilor celulare de cancer mamar triplu negativ	68
3.4.2. Profilul de expresie genică în array-ul de apoptoză	70
3.4.3. Validarea prin RT-PCR TaqMan assay	76
3.5. Discuții	78
3.6. Concluzii	82
4. Studiul 3: Compușii naturali și capacitatea lor de a modula expresia genelor necodificatoare de proteine	85
4.1. Introducere	85
4.2. Ipoteza de lucru	86
4.3. Materiale și metode	87
4.3.1. Linii celulare de cancer colorectal	87
4.3.2. Compuși naturali	87
4.3.3. Evaluarea viabilității celulare prin testul MTT	87
4.3.4. Izolarea ARN-ului din linii celulare	88

4.3.5. Analiza de microarray	89
4.3.6. Validarea prin qRT-PCR a moleculelor de ARN lungi	90
4.3.7. Validarea prin qRT-PCR a micro ARN-urilor	91
4.3.8. Numararea celulelor și observarea modificarilor morfologice	91
4.3.9. Evaluarea capacității de invadare și migrare a celulelor	91
4.3.10. Testul clonogenic	92
4.4. Rezultate	92
4.4.1. Efectele inhibitorii a EGCG-ului și genisteinei asupra celor două linii celulare de cancer colorectal	92
4.4.2. Modificările generate de EGCG și genisteină la nivelul transcriptomului necodificant	96
4.4.3. Identificarea modificărilor obținute la nivelul moleculelor de ncRNA în urma tratamentului cu EGCG și genisteină	98
4.4.4. Validarea analizei de microarray prin qRT-PCR	102
4.4.5. EGCG-ul și genisteina prezintă efecte inhibitorii asupra capacității de migrare și invazie a liniilor celulare RKO și HCT116	104
4.4.6. Potențialul compușilor naturali de a induce apoptoza și de a inhiba capacitatea celulelor tumorale colorectale de a migra	106
4.5. Discuții	109
4.6. Concluzii	112
5. Discuții generale și concluzii	115
5. Originalitatea tezei	119
Referințe	121

CUVINTE CHEIE: cancer, molecule de ARN necodificante, molecule mici de ARN de interferență, micro ARN-uri, molecule lungi necodificatoare de ARN, compuși naturali, genisteină, EGCG, modulare genică, microarray

INTRODUCERE

Cancerul este una dintre cauzele majore de deces în întreaga lume. Cu toate că pentru anumite tipuri de cancer nivelul de incidență a scăzut datorită metodelor noi și eficiente de detecție, tratarea acestei patologii încă prezintă dificultăți.

În funcție de caracteristicile moleculare ale fiecărui tip tumoral, pacienții răspund diferit la același tratament, drept urmare având rezultate diferite. Astfel, o bună caracterizare a particularităților moleculare ale fiecărui pacient este foarte importantă. Acest lucru depinzând de evaluarea acurată a analizelor moleculare. Uneori tipul de procedură chirurgicală aleasă cât și manipularea ulterioară a probelor biologice duce la degradarea acestora, ceea ce afectează caracterizarea moleculară a probelor. Cea mai precisă, eficientă și ieftină metodă de identificare a nivelului de expresie genică este tehnica de qRT-PCR. Prin urmare, primul obiectiv al tezei a fost de a stabili dacă după utilizarea metodei TURBC (de rezecția transuretrală a cancerului de vezică urinară), se pot obține rezultate relevante prin qRT-PCR în ceea ce privește evaluarea nivelului de expresie genică și al micro ARN-urilor.

Există o necesitate mare în dezvoltarea de noi strategii terapeutice care să fie mult mai eficiente și mai puțin toxice. Astfel, în cea de-a doua parte a tezei se va discuta despre două noi potențiale metode de tratare a cancerului. Terapiile moleculare care se bazează pe inhibiția genică au fost recunoscute de la început ca fiind noi potențiale metode de tratare a cancerului. Funcția lor este de a inhiba oncogenele și genele care promovează supraviețuirea celulelor tumorale. Astfel în cel de-al doilea studiu al tezei se abordează tehnica de inhibiție genică cu scopul de a dezvolta noi strategii terapeutice pentru tratarea patologiilor maligne care nu răspund la tratamentul cu citostatice. Astfel, cel de-al doilea obiectiv al tezei este de a determina dacă inhibiția simultană a genelor p53 mutantă și TNF va induce apoptoza în liniile celulare de cancer mamar triplu negativ. Pentru o mai bună înțelegere a interacțiunilor dintre aceste două gene în mecanismele celulelor tumorale de supraviețuire, analize genice și funcționale au fost efectuate.

O a doua propunere pentru dezvoltarea de noi strategii terapeutice țintite în tratamentul cancerului este utilizarea compușilor naturali. O serie de compuși naturali au fost modificați structural și optimizați iar în acest moment stau la baza unor citostatice comerciale. Prin urmare, atenția cercetătorilor sa întreprins asupra compușilor naturali ca potențiali regulatori ai moleculelor de ARN necodificante. Astfel al treilea obiectiv al tezei a fost de a investiga modul în care cei doi polifenoli, EGCG și genisteină afectează expresia micro ARN-urilor și a ARN-urilor lungi necodificatoare în două linii celulare tumorale colorectale.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul reprezintă o multitudine de boli înrudite. Această patologie poate fi definită ca o creștere abundentă de celule transformate care au pierdut capacitatea de a intra în apoptoză, au câștigat proprietatea de a prolifera necontrolat, devenind nemuritoare, în cele din urmă dobândind potențialul de a se răspândi în organism (de

a metastaza). Apariția și evoluția patologiei maligne este un proces alcătuit din mai multe etape care duc la acumularea de caracteristici maligne având drept rezultat transformarea celulelor. O dată cu apariția noilor tehnologii de analiză moleculară, au avut loc noi descoperiri, care au dus la identificarea moleculelor de ARN cu funcții necodificatoare de proteine. Acest lucru fiind posibil datorită dezvoltării de noi instrumente și softuri de analiză genomică cu capacitatea de a furniza date exacte. Până la apariția acestor tehnici cea mai mare parte a genomului uman era considerată "materie neagră", apoi s-a demonstrat că de fapt această zonă a genomului este transcrisă. La modul general moleculele de ARN care nu codifică proteine sunt numite molecule de ARN necodificatoare (ncARN). În funcție de rolurile pe care le îndeplinesc, aceste molecule sunt de două tipuri, clasice sau molecule de ARN "housekeeping" și moleculele de ARN cu funcție reglatoare. ARN necodificatoare cu roluri reglatorii ale expresiei genelor sunt la rândul lor clasificate în funcție de lungime în micro ARN-uri (miRNA) și molecule lungi de ARN necodificant (lncRNA)

Descoperirea moleculelor de ARN mici a avut un impact profund asupra biologiei moleculare precum și asupra înțelegerii proceselor de reglare genică. Aceste molecule mici de ARN necodificatoare au fost denumite micro ARN-uri sau miARN-uri, și au o lungime de 19 până la 25 de nucleotide, cu rolul reglator. Mecanismul prin care își exercită funcția se numește ARN de interferență (ARNi). ARNi este un mecanism de reglare înalt conservat la nivelul celulelor eucariote care determină inhibiția genică la nivel post-transcripțional. După descoperirea acestui mecanism acum mai bine de două decenii a apărut noua era a terapiei țintite care se bazează pe modularea moleculelor de ARN.

Calea de semnalizare a ARNi este declanșată fie de micro ARN-uri, care sunt sintetizate în interiorul celulei, fie de molecule mici de interferență (siARN) care sunt sintetic obținute. SiARN-urile sunt considerate una dintre cele mai importante descoperiri din biologie, datorită capacității lor de a modula expresia țintită a genelor. Sunt utilizate ca unelte în investigarea căilor de semnalizare. Datorită capacității lor de inhibiție specifică a moleculelor țintă de ARNm s-au pus bazele dezvoltării de noi strategii terapeutice cu potențiale aplicații benefice în tratarea cancerului.

Moleculele lungi de ARN necodificatoare au o lungime mai mare de 200 nucleotide, nu prezintă un cadru deschis de citire funcțională (ORF) și nu prezintă structuri secundare. De obicei, lncARN prezintă o expresie scăzută, motiv pentru care au fost inițial considerate a fi "zgomot de transcriere" și, prin urmare, greu de analizat și studiat. Studii efectuate pe tetrapode au demonstrat faptul că moleculele de lncARN nu au fost conservate în mod evolutiv cu excepția a aproximativ 3% dintre ele care sunt transcrise din regiuni ale genomului ultraconservate. În funcție de unde sunt localizate la nivel celular, lncARN-urile prezintă diferite funcții reglatorii. Majoritatea

dintre ele sunt localizate în nucleu și au capacitatea de a acționa ca reglatori ai expresia genelor. LncARN care se află în citoplasmă joacă un rol important în stabilitatea moleculelor de ARNm cât și în reglarea transducției semnalelor.

Plantele prezintă compuși bioactivi cu potențiale efecte benefice în organismul uman. Cei mai mulți dintre ei ascund diverse activități biologice care joacă un rol important în tratarea diverselor patologii. Ca un compus natural să prezinte potențiale beneficii curative trebuie să prezinte anumite caracteristici cum ar fi: eficiență sporită, efecte secundare scăzute, să prezinte un mecanism de acțiune bine caracterizat, să nu prezinte efecte dăunătoare asupra celulelor normale, să fie rentabil și ușor de administrat.

Studiul 1: Influențele rezecției transuretrale a tumorilor de vezică urinară asupra calității acizilor nucleici

Informațiile obținute în urma evaluării acizilor nucleici cu instrumentul NanoDrop și Bioanalizor 2100 sunt esențiale pentru efectuarea analizelor ulterioare de expresie genică cât și pentru estimarea calitativă și cantitativă a probelor de ARN. Prin urmare, aceste tehnici vin în ajutorul investigărilor care astfel pot estima rata de succes a ulterioarelor experimente genomice.

ARN-ul extras din probe biologice care sunt supuse unor tehnici operatorii ce produc degradarea materialului biologic, cum este cazul TURBC pot fi utilizate în analiza expresiei genice cât și de microARN-uri în anumite condiții. La speciile lungi de ARN, datorită lungimii lor, stabilitatea moleculară scade și, prin urmare, acestea prezintă un potențial de degradare mai mare. Chiar și așa, cu ajutorul unor gene housekeeping stabile care să ajute la normalizarea datelor de qRT-PCR, se pot obține informații valoroase din probe de slabă calitate.

În primul capitol al tezei după efectuarea analizelor de qRT-PCR se poate observa că genele housekeeping GAPDH și 18S au expresie genică (definită prin valorile Ct) mult mai stabilă decât β -actina. Astfel pot fi folosite drept gene raportor în cazul probelor biologice degradate. Pentru evaluarea microARN-urilor s-a observat că gena raportor U6 poate fi folosită drept gene de referință pentru normalizarea rezultatelor. Din datele obținute în urma analizei de qRT-PCR pentru miRNA-28-3p și 5p se observă că manipularea probelor biologice nu afectează expresia acestor molecule, astfel pentru microARN-uri rezultatele obținute din probe de calitate slabă sunt de încredere.

Studiul 2: Inhibarea concomitentă a genelor p53 mutantă și TNF în cancerul mamar triplu negativ

O mai bună înțelegere a mecanismelor de interacțiune dintre gena p53 mutantă și gena TNF în cancerul mamar triplu negativ va genera informații importante cu

privire la această patologie și, probabil, va conduce la dezvoltarea de noi strategii terapeutice. Astfel în cel de-al doilea capitol al tezei se demonstrează că în urma inhibiției concomitente a genelor p53 mutantă și TNF, analize efectuate pe două linii celulare de cancer mamar triplunegativ, are loc o creștere a expresiei genelor proapoptotice TRAIL și FAS. De asemenea se poate observa și o creștere a genei Casp 8, un activator al caspazelor efectoare care controlează mecanismele apoptotice de la nivelul celular.

Prin analize funcționale se poate observa că inhibarea concomitentă a celor două gene induce apoptoza. Acest lucru sa demonstrat prin marcarea celulelor cu coloranți fluorescenți (Anexina-V și TMRE) și observarea lor sub un microscop cu fluorescență. În sprijinul rezultatelor obținute anterior vin cele de viabilitate celulara, unde după 24 de ore de la transfecție se observă o reducere a numărului de celule viabile. Urmand ca viabilitatea să scadă și mai mult după 48 de ore. Prin analize de fluorescență s-a demonstrat de asemenea că în urma transfecției concomitente cu siARN pentru p53 și TNF nu au fost induse mecanisme de autofagie sau necroză celulară. Astfel, reducerea numărului de celule viabile în urma transfecției se datoreaza activării mecanismelor apoptotice.

În cadrul acestui studiu s-a demonstrat atat prin tese de expresie genică cât și funcționale că în urma inhibiției concomitente a genelor p53 mutantă și TNF în cancerul mamar triplu negativ este indusă apoptoza. În urma efectuării acestui experiment au fost identificate noi gene cu efect reglator în cadrul mecanismelor apoptotice.

Studiul 3: Compușii naturali și capacitatea lor de a modula expresia genelor necodificatoare de proteine

În cadrul celui de al treilea studio al teze s-a demonstrat că ambii compuși naturali (genisteină și EGCG) prezintă la doze mari efecte antiproliferative asupra celor două linii celulare tumorale colorectale. Prin utilizarea a jumătate din doza de inhibare maximă cât și creșterea perioadei de incubare (la 48 de ore) cu cei doi compuși s-a stabilit că efectele observate la nivel celular vor induce modificări și la nivel molecular.

Astfel în acest studiu s-a demonstrat pentru prima dată la nivel de *in vitro* faptul că compușii naturali EGCG și genisteină induc modificări la nivelul moleculelor de ARN necodificatoare. Astfel pentru toate condițiile experimentale a fost obținut un panel de miARN-uri, lncARN-uri și lncARN-uri transcrise din regiuni ultraconservate care sunt fie supraexprimate fie subexprimate.

Prin intermediul analizei de microarray s-au evaluat modificările induse de incubarea celulelor cu EGCG și genisteina asupra moleculelor de ARN necodificatoare.

Prin compararea rezultatelor obținute în cele două linii celulare de cancer colorectal, se poate considera că moleculele de ARN necodificante sunt marker pentru tratamentul fie cu EGCG fie cu genisteină. Această analiză a generat informații prețioase cu privire la capacitatea celor doi compuși naturali de a altera expresia moleculelor de ARN necodificatoare. Acest lucru ar putea sta la baza dezvoltării de noi medicamente împotriva cancerului colorectal precum și la identificarea de biomarkeri pentru rezistența la tratament.

La modul general, genisteina prezintă o mai bună capacitate de modulare a expresiei moleculelor de ARN necodificante. De asemenea în cadrul experimentelor s-au putut efectua corelații mai bune între rezultatele biologice și cele genice obținute în urma tratamentului cu genisteină. În urma analizelor funcționale s-a observat că EGCG-ul prezintă efecte imediate care scad în timp. Aceste efecte pot fi observate și la nivel molecular.

Originalitatea tezei

Elementul de noutate al tezei constă în abordarea propusă pentru terapia genică în cancerul de sân triplu negativ. Inhibarea concomitentă a genei mutante p53 și TNF au fost alese drept ținte datorită implicării lor în mai multe căi de semnalizare. Gena p53, cunoscută și sub numele de "gardianul genomului", controlează stabilitatea genomică, este activată în momentul în care apar breșe la nivelul catenelor de ADN, la activarea oncogenelor și în cazul altor condiții de stres celular, prin declanșarea de semnale antiproliferative. În numeroase patologii maligne p53 își pierde funcția prin acumularea de mutații, dar nu și capacitatea de a interacționa cu alte proteine. TNF este o citokină cu funcții duale în cancer, de inhibare sau de activare a mecanismelor apoptotice. În cancerul mamar triplu negativ s-a observat că susține proliferarea celulelor tumorale și inhibă apoptoza. Astfel noutatea studiului constă în alegerea genelor care urmează a fi inhibate (p53 și TNF), în metoda experimentală utilizată (efectuarea transfecției cu molecule de siARN), cât și prin modul de concepere al studiului (inhibarea concomitentă a genelor). Prin designul de studiu s-a ajuns la activarea unor mecanisme compensatorii de susținere a căilor de semnalizare apoptotice. Prin urmare, această abordare poate sta la baza dezvoltării unei noi strategii terapeutice cu ajutorul moleculelor de siARN în tratarea cancerului mamar triplu negativ.

Al doilea element de noutate al tezei constă în efectuarea profilului moleculelor de ARN necodificante obținut în urma incubării cu EGCG și genisteină a două linii celulare de cancer colorectal. În ceea ce privește cunoștințele noastre în domeniu, până în prezent nu s-a efectuat nici o caracterizare a modificărilor generate de cei doi compuși naturali la nivelul populațiilor de microARN-uri și ARN-

uri lungi necodificatoare. Ambii compuși prezintă capacitatea de a inhiba moleculele de ARN necodificante cu rol oncogen și de a le stimula pe cele cu rol de supresori tumorali. Astfel aceste flavonoide au capacitatea de a influența mai multe cai de semnalizare care duc la inhibarea proliferării celulelor tumorale și inducerea apoptozei, cu potențială aplicabilitate în tratamentul cancerului.

"IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA

DOCTORAL SCHOOL

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

New cancer treatment strategies applying functional genomics analysis

PhD student **Valentina Pileczki**

PhD supervisor **Prof. Dr. Robert Săndulescu**

CLUJ-NAPOCA 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of Contents

INTRODUCTION	19
STATE OF THE ART	21
1. Cancer cell particularities	23
2. Non coding RNAs in cancer biology	31
2.1. Long non-coding RNAs mechanisms and function in cancer	31
2.2. Transcribed ultraconserved regions in human cancer	33
2.3. MicroRNAs biogenesis and function	34
2.4. RNA interference	35
2.4.1. Mechanisms of siRNA mediated RNA interference	35
2.4.2. Designing strategies and selection of highly functional siRNAs	36
2.4.3. Major problems of siRNA therapeutics	37
2.4.4. SiRNA delivery systems	38
2.4.5. Liposomal siRNA nanocarriers for cellular transfection	39
3. Natural compounds in cancer	41
3.1. Benefits of Epigallocatechin gallate	42
3.2. Benefits of Genistein	42
PERSONAL CONTRIBUTIONS	45
1. Working hipotesis / Objectives	47
2. First study: The influence of transurethral resection of bladder tumors on nucleic acid quality	49
2.1. Introduction	49
2.3. Materials and methods	50
2.3.1. Patients	50
2.3.2. Sample collection, processing and RNA extraction	51
2.3.3. RNA assessment	52
2.3.4. Quantitative Real Time PCR for mRNA	52
2.3.5. Quantitative Real Time PCR for miRNA expression	53
2.4. Results	53
2.4.1. Quantitative assessment of total RNA	53

2.4.2. Qualitative assessment of RNA samples	53
2.4.4. MiRNA pattern evaluation	55
2.4.3. Gene expression assay	55
2.4.5. Correlation between gene expression and miRNA and quality control parameters	56
2.5. Discussions	57
2.6. Conclusion	60
3. Second study: Simultaneously gene regulation of mutant p53 and TNF in triple negative breast cancer	63
3.1. Introduction	63
3.2. Working hypothesis	64
3.3. Material and methods	64
3.3.1. Cell lines	64
3.3.2. Cell number and siRNA concentration used for transfection	65
3.3.3. MTT cell viability assay	66
3.3.4. Annexin V-FITC and TMRE (tetramethylrhodamine) staining	66
3.3.5. Autophagy/Cytotoxicity evaluation	66
3.3.6. RT-PCR array gene expression analysis	67
3.3.7. TaqMan RT-PCR gene expression evaluation	67
3.3.8. Protein analysis through western blot	68
3.4. Results	68
3.4.1. Double genes inhibition promotes apoptosis in TNBC cell line	68
3.4.2. Gene expression profile in apoptosis array	70
3.4.3. Validation by RT-PCR TaqMan assay	76
3.5. Discussions	78
3.6. Conclusion	82
4. Third study: Natural compounds and their capacity to modulate the non protein coding transcriptome	85
4.1. Introduction	85
4.2. Working hypothesis	86
4.3. Materials and Methods	87
4.3.1. Colorectal cancer cell lines	87
4.3.2. Natural compounds	87
4.3.3. Evaluation of cell viability through MTT assay	87
4.3.4. RNA isolation from cell lines	88
4.3.5. Microarray analysis	89

4.3.6. qRT-PCR validation of lncRNAs	90
4.3.7. qRT-PCR validation of miRNAs	91
4.3.8. Counting and morphology observation of the cells	91
4.3.9. Transwell Migration and Invasion assay	91
4.3.10. Colonogenic assays	92
4.4. Results	92
4.4.1. Inhibitory effects of EGCG and genistein in cell proliferation of two colon cancer cell lines	92
4.4.2. Non-coding transcriptome changes determined by EGCG and genistein	96
4.4.3. Identification of dysregulated ncRNAs expressed after EGCG and genistein treatment	98
4.4.4. qRT-PCR validation of the microarray	102
4.4.5. EGCG and genistein presents inhibitory effects on the migration and invasion of RKO and HCT116 cell lines	104
4.4.6. Natural compounds capacity to induce apoptosis and to block colon cancer cell capacity to metastasis	106
4.5. Discussions	109
4.6. Conclusions	112
5. General discussions and conclusions	115
6. Originality of the thesis	119
REFERENCES	121

KEY WORDS: cancer, non coding RNAs, small interfering RNAs, micro RNAs, long non-coding RNAs, natural compounds, genistein, EGCG, gene modulation, microarray

INTRODUCTION

Cancer is one of the major causes of deaths worldwide. Although for certain types of cancers the level of incidence has decreased due to new and efficient methods of detection, cancer treatment still poses difficulties.

Based on the tumour molecular characteristics, cancer patients present different outcomes and respond differently to treatment. Therefore, a good characterisation of each patient's molecular status is highly important. This depends on the molecular analysis used for the evaluation. Sometimes surgical options and

sample manipulation leads to sample degradation, which affects the molecular characterisation of the sample. The most precise, rapid and cost efficient way of identifying the expression level of a certain gene or non-coding RNA is qRT-PCR. Therefore, the first objective of this thesis was to establish if after using the TURBC (transurethral resection of bladder cancer) resection method, in the context of messenger RNA and small RNA integrity, relevant qRT-PCR data can be obtained.

The development of new treatment strategies that are more effective and less toxic is of great need. Therefore, in the second part of the thesis two new potential approaches for cancer treatment are discussed. Molecular based therapies that trigger gene silencing have quickly been recognised as potential new classes of treatment strategies that interfere with oncogenes and cancer specific promoting genes. In the second study of the thesis this approach was used with the purpose of developing new therapeutic strategies for virtually untreatable tumor types. In this way, a second objective of the thesis was to determine if simultaneously inhibiting mut-p53 and TNF may trigger apoptosis in triple negative breast cancer cell lines. Functional and gene expression analyses were performed to better understand the interplay of these two genes in the mechanisms of cancer cell survival.

A second approach for developing new targeted based therapeutics for cancer is the use of natural compounds. In cancer treatment a number of natural compounds have been structurally modified, optimized, and stand now at the basis of important commercial drugs. Therefore, the attention was directed toward natural compound as regulators of non-coding RNAs function in colon cancer. The third objective of the thesis was to investigate how the two polyphenols, EGCG and genistein affect the expression of microRNAs and long non-coding RNAs in two colon cancer cell models.

STATE OF THE ART

Cancer is a multitude of related diseases. It can be defined as an abundant growth of abnormal cells that lost their capacity to avoid death, gained the potential to proliferate in an abnormal way, become immortal and poses the capacity to spread (metastasise). Cancer formation and evolution is a multistep and highly regulated process that enables incipient cancer cells to acquire characteristics that allow them to become malignant. With the emerging of new and precise techniques in cancer research, came the discovery of RNA molecules transcribed from regions of the genome that do not code for genes. This was made possible with the help of modern functional genomic instruments that generate highly accurate data. Up to that moment, most of the human genome was considered to be "dark matter", but a much larger part is transcribed into RNA than originally assumed. Generally, RNA molecules that do not code for proteins are named non-coding RNAs (ncRNAs). Based on their function, ncRNAs are divided in two major categories, the classical "housekeeping"

RNAs and the regulatory ncRNAs. The ncRNA molecules that play regulatory functions, depending on their size, are classified in two groups known as the small non coding RNAs (sncRNAs) and long non coding RNAs (lncRNAs).

The discovery of small non-coding RNAs had a profound impact on molecular biology and the understanding of gene regulatory processes. These small non-coding RNAs were named microRNAs or miRNAs and are 19 to 25 nucleotides in length and have the property to regulate gene expression. The mechanism through which they exercise their function is named RNA interference (RNAi). RNAi is a highly conserved regulatory process that determines gene silencing at post-transcriptional level in most eukaryotic cells. After its discovery almost two decades ago came the new era of RNA based targeted therapies.

RNAi mechanisms are triggered either by microRNAs (miRNAs) that are endogenously produced, or by small interfering RNAs (siRNAs) that are synthetically obtained. SiRNAs are now considered one of the most important advantages in biology, due to their capacity to modulate targeted gene expression. They are used as powerful tools for silencing and investigating genes. Knowing their capacity to target specific mRNA molecules, scientists have made considerable efforts in developing siRNA applications in harnessing new therapeutic tools for the treatment of cancer and other diseases.

lncRNAs are RNA molecules longer than 200 nucleotides that lack a functional open reading frame (ORF) of significant length and present secondary structures. Usually, lncRNAs present low expression, that is why they were initially thought to be "transcriptional noise" and therefore hard to be analysed and their function studied. Large studies performed in tetrapods observed that lncRNAs are poorly conserved with the exception of approximately 3% that are transcribed from ultra-conserved regions of the genome. Depending on their localization in the cell, lncRNAs present different regulatory functions. As the majority of them are located in the nucleus, they possess the ability to act as gene expression regulators. lncRNAs that localize to the cytoplasm play an important role in mRNA stability and regulate signal transduction.

Botanicals contain bioactive components, including some that were observed to present potential health benefits. Most of them harbour various biological activities that play an important role in therapeutics. For a natural compound to pose such benefits it must present certain characteristics such as high efficiency in multiple sights, minimal side effects, to have a well characterized mechanism, have no effect on normal cells, be cost efficient and easy to administer.

First study: The influence of transurethral resection of bladder tumors on nucleic acid quality

The informations provided by the NanoDrop and Bioanalyzer 2100 are essential for the success of downstream experiments and provides a good estimation of sample quality in terms of nucleic acid purity and integrity. Therefore, these techniques can provide the investigator with a good idea of what the success of subsequent experiments will be.

RNA obtained from biological samples that undergo degrading techniques like the one used in TURBC procedure can still be used in profiling studies of the miRNAs and generate accurate data. In longer RNA species, due to their length, the molecular stability decreases and therefore they present a higher degradation potential. Even so, with suitable normalization and an adequate panel of housekeeping genes used as reporters, information from poor quality samples can still be obtained through qRT-PCR analysis.

As observed in this first study after performing qRT-PCR gene expression analysis, the housekeeping genes GAPDH and 18S had Ct values that were more stable, in terms of sample homogeneity, than β -actin, and therefore can be used as reporters in experiments with poor quality material. For the microRNA studies, U6 was observed to be a suitable normalizer. Also, from the amplification data obtained through qRT-PCR of miRNA-28-3p and 5p it is observed that biological sample manipulation does not affect their expression and results obtained for poor quality samples can be trustworthy.

Second study: Simultaneously gene regulation of mutant p53 and TNF in triple negative breast cancer

A better understanding of mut-p53 and TNF interplay in TNBC molecular mechanisms will bring important information regarding this pathology and perhaps will lead to the development of new therapeutic strategies. In this study it was demonstrated that by simultaneously inhibiting mut-p53 and TNF gene expression in two triple negative breast cancer cell lines triggered at gene level an up-regulation of proapoptotic factors like TRAIL and FAS. An up-regulation of Casp 8, the activator of effector caspases that fulfill apoptotic changes at cellular level, was also seen.

Through functional analyses it was observed that simultaneous double gene knockdown induced apoptosis. This was demonstrated by staining the cells with apoptotic markers (Annexin V and TMRE) and observing them under a fluorescent microscopy. The results are supported by cell viability analysis, where the number of viable cells decreased first after 24 hours from the transfection. An even higher decrease in the number of viable cells was observed after 48 hours. It was also

demonstrated through fluorescent microscopy that siRNA mut-p53 and TNF simultaneous knockdown did not induce necrosis or autophagy. Therefore, the reduction in cell number can only be associated with apoptosis.

Both functional and gene expression data suggest that mut-p53 and TNF simultaneous inhibition can be involved in triggering apoptotic mechanisms in TNBC cell lines. Through this approach new key regulators of apoptosis in TNBS were identified. Therefore, this strategy can be used to establish new approaches in the management and potential gene therapy development for triple negative breast cancer.

Third study: Natural compounds and their capacity to modulate the non protein coding transcriptome

Within selected experimental terms we managed to demonstrate that both natural compounds (genistein and EGCG) exhibit at high doses antiproliferative effects. By using the half maximal inhibitory dose and performing a long incubation step with the compounds (48 hours) it was ensured that the changes observed at cellular level will trigger the same level of changes at molecular level.

In this study it was established for the first time that both EGCG and genistein induces ncRNA profile changes in two colon cancer cell lines. For all experimental conditions it was obtained a panel of up- and down-regulated miRNAs, lncRNAs and T-UTRs.

By comparing the results obtained in one cell line with the results obtained in the second one, the commonly expressed ncRNAs can be considered as response markers for EGCG and genistein treatment. By characterising through microarray analysis the changes induced in ncRNA population after EGCG and genistein individual incubation of colon cancer cell lines may provide useful information to understand non-coding transcriptome response to both natural compounds. This could stay at the base of developing new anticancer drugs and also it could help identify new biomarkers for drug resistance in colorectal cancer.

Generally, genistein showed a better capacity of modulating non-coding RNA expression and, also, better correlations with the biological effect of this compound could be established. Through functional analysis it was observed that EGCG effects in both cell lines were immediate and decreased with time. These effects can also be observed in the microarray analysis of the ncRNAs.

Originality of the thesis

The novelty of the thesis consists in the approach proposed for gene therapy in triple negative breast cancer. Simultaneous gene inhibition of mutant p53 and TNF were chosen as targets due to their implication in multiple signaling pathways. P53,

also known as the “guardian of the genome” that oversees genomic stability, is activated when DNA damage acquires, in oncogene stimulation and a variety of other stressful conditions, by triggering a broad range of antiproliferative signals. In numerous cancers p53 loses its function by accumulating mutations, but does not lose its capacity to interact with other proteins. TNF is a cytokine with dual function in cancer, which was observed to either block or stimulate apoptosis. In TNBC it was observed to support tumor cell proliferation and inhibit apoptosis. Therefore, the novelty stands in the two target genes chosen to be inhibited (mut-p53 and TNF), in the method chosen to do so (both through siRNA transfection), and in the design of the approach (simultaneous gene inhibition). All these features combined together lead to the activation of countervailing mechanisms that sustain apoptosis. Therefore, this approach can stand at the basis of a novel siRNA-based therapy for triple negative breast cancer.

Second novelty element of the thesis is the profiling of ncRNAs in response to the modulating capacity of two natural compounds tested in two colon cancer models. As far as our knowledge goes, no other attempts in profiling both micro RNA and long non-coding RNA populations in response to EGCG and genistein in colorectal cancer have been made. Both compounds possess the capacity to simultaneously down-regulate the expression of oncogenic ncRNAs and up-regulate the expression of tumor suppressor ones. Thereby these flavonoids possess the capacity to influence multiple signaling pathways leading to the inhibition of tumor growth and induction of apoptosis, with major applications in cancer treatment.