
SUMMARY OF THE PhD THESIS

Novel diagnosis and therapeutic strategies in cancer. The role of non-coding RNAs

PhD Student **Diana Gulei**

PhD Coordinator Prof.dr. **Ioana Neagoe**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Non-coding RNAs – from biogenesis to cell signaling regulation	19
1.1. Quantitative distribution of RNA species within the cell	19
1.2. Biogenesis of non-coding RNAs – focus on miRNA	21
1.3. Regulatory roles of other ncRNAs	22
2. MicroRNAs in cancer – present knowledge and future perspectives	25
2.1. Basis of miRNAs dysregulation in cancer	26
2.1.1. Deletion or amplification of miRNA regions	26
2.1.2. Changes in transcriptional mechanisms associated with miRNAs dysregulation	26
2.1.3. Epigenetic modifications of miRNAs	27
2.2. Differential expression of miRNAs in cancer	28
2.3. miRNA trafficking via exosomes in cancer	30
3. Involvement of microRNAs in cancer hallmarks – focus on apoptosis and metastasis	35
3.1. Cell death mechanism in cancer – implications in experimental therapies	35
3.1.1. Mechanism of apoptosis	36
3.1.2. MicroRNAs with roles in apoptosis	37
3.2. Invasion in metastasis as response to EMT activation in cancer	38
3.2.1. Mechanism of EMT	39
3.1.2. MicroRNAs with roles in EMT	40
4. Theranostic value of microRNAs – current approaches	43
4.1. miRNAs with potential in clinical testing	44
4.2. miRNA therapeutic strategies in cancer	45
4.2.1. MiRNA delivery strategies	45
4.2.2. Novel miRNA modulation approaches – exosomes delivery and CRISPR/Cas mediated editing	46

PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis/objectives	51
2. General methodology	51
3. Study 1 – Screening of microRNAs with potential therapeutic impact in solid malignancies	53
3.1. Introduction	53
3.2. Work hypothesis	54
3.3. Materials and methods	54
3.4. Results	56
3.5. Discussions	58
3.6. Conclusion	59
4. Study 2 – Experimental restoration of mir-205-5p is inhibiting epithelial to mesenchymal transition in colon cancer with effects upon cancer aggressiveness	61
4.1. Introduction	61
4.2. Work hypothesis	62
4.3. Materials and methods	62
4.4. Results	66
4.5. Discussions	89
4.6. Conclusion	90
5. Study 3 – MicroRNA-125b in colon cancer therapy – a mechanism dependent on TP53 status	91
5.1. Introduction	91
5.2. Work hypothesis	92
5.3. Materials and methods	92
5.4. Results	94
5.5. Discussions	108
5.6. Conclusion	109
6. General discussions	111
7. General conclusions	113
8. Novelty and innovation	115
REFERENCES	117

Keywords: cancer, microRNAs, targeted therapy, metastasis, apoptosis, preclinical research

INTRODUCTION

Since the initial discovery of miRNAs deregulations in malignant pathologies (1), these small non-coding sequences have been intensively investigated. Numerous groups proposed their use as minimal invasive diagnostic and prognostic tools, while others have highlighted their potential role as therapeutic targets in cancer. Almost 17 years later (from the first manuscript about miRNAs regulatory roles in cancer) and over 100.000 articles published worldwide about miRNAs, these sequences are still far away from the clinic. The first and single attempt of an interventional clinical study (MRX34) was rapidly withdraw after aggressive side effects. Even if at the current time there are 729 clinical studies involving miRNAs, most of them are observational and include the assessment of specific non-coding signatures associated with the installation or evolution of the investigated pathology (clinicaltrials.gov, search: miRNA, date: 29 December 2018).

Although surprising, the slow evolution of miRNAs toward the clinic is justified by their complex modulatory roles, where systemic effects upon administration are hard to quantify. One single miRNA has several hundreds of target genes, and one mRNA transcript can be targeted by numerous miRNAs. Therefore, even if the classical approach in terms of cancer therapeutics consists in administration of mimic sequences for the downregulated miRNAs and inhibition of those overexpressed, this strategy is not necessarily feasible. One single miRNA can directly reach a large number of target genes, genes that will further propagate the effects within downstream signaling. Therefore, miRNAs as single agents in high and repetitive doses in cancer can actually activate also oncogenic pathways within their numerous effects, counteracting, at least in part, the beneficial ones. Moving further to the diagnosis or prognosis value, the same issue is encountered. Due to the complex and heterogeneous molecular roles, the level of the same miRNA can be altered in a simple condition like a cold or in more life-threatening diseases. Moreover, how we manage the patients that have additional pathologies that can affect the circulatory levels of a miRNA or miRNA signature?

The present thesis presents another approach on miRNA therapeutics, where these sequences are actually used as sensitizers or the cancer cells due to their numerous targets, meant to increase the efficiency of the second line of treatment. Also, we offer mechanistic insights into the modulatory roles of controversial miRNAs in order to highlight the importance of careful consideration of the patient molecular profile before administration of exogenous non-coding sequences. Therefore, while in same patients a specific miRNA can be beneficial, in others (with the same pathology), the same miRNA has minimal effects or even negative ones.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

This first part of the thesis has the purpose of introducing the reader into the sector of microRNAs in cancer and their role in modulating extensive signaling networks within the cell. The segment of the current knowledge is divided into four chapters that have a chronological orientation and also a sequential increase in respect to the content complexity. Specifically, the first chapter (Non-coding RNAs – from biogenesis to cell signaling regulation) presents the biogenesis of non-coding RNAs and also their quantitative distribution within the cell together with an overall perspective upon their modulatory role; the second chapter (MicroRNAs in cancer – present knowledge and future perspectives) comprises the dysregulation of microRNAs in malignant cells and their functionality in sustaining the carcinogenesis process; the third chapter (Involvement of microRNAs in cancer hallmarks – focus on apoptosis and metastasis) is associated with the role of microRNAs in apoptosis and metastasis, the two main mechanisms that were addressed in the PhD thesis and finally, chapter four (Therapeutic value of microRNAs – current approaches) with the main therapeutic strategies involving microRNAs in cancer.

PERSONAL CONTRIBUTION

The present thesis is divided within 3 main studies that all together have the objective of identifying miRNAs with potential therapeutic roles in solid malignancies (with later focus on colon cancer).

Study 1. Screening of microRNAs with potential therapeutic impact in solid malignancies

Despite significant progress in cancer research, this pathology is still classified as one of the deadliest diseases with minimal modifications in incidence and mortality rates in the last years. These concerning statistics are mainly caused by late diagnosis, where advanced tumors are often difficult to treat, but also installation of drug resistance through activation of compensatory mechanisms. According to Globocan database, breast, colorectal and bladder cancer are among the top malignancies in terms of both incidence and mortality percent (2).

The present study aimed at the selection of the appropriate miRNAs that could be further used in experimental therapeutic strategies along with the solid malignancy where it has the most pathological profile. We screened three types of solid tumors (breast, colorectal and bladder cancer) where the current treatment options are

limited, fact demonstrated by the concerning mortality rates. The two main miRNAs that were involved in the study consists in miR-205-5p and miR-125b-5p; these two sequences were previously associated with aberrant expression in cancer and also with key mechanisms like EMT and apoptosis respectively.

Specifically, we analyzed three distinct solid malignancies for miR-205-5p and miR-125b-5p expression by incorporating tumor tissue and matched controls. The general trend associated with these sequences is represented by a downregulated profile. However, in bladder cancer miR-205-5p was found as upregulated, showing the context dependent role of this non-coding transcript. In breast cancer, both miRNAs are significantly downregulated, with a more homogenous profile for miR-205-5p; miR-125b-5p downregulation is acquired mainly due to several outliers within the analysis. The same pattern was found in colon adenocarcinoma cohorts, but with a more homogenous profile in tumor tissue, where both miRNAs were at minimal expression in each sample. Considering these data, we concluded that miR-205-5p and miR-125b could hold relevant tumor suppressor functions in colon cancer, where replacement strategies could impact the phenotype of cancer cells.

Study 2. Experimental restoration of mir-205-5p is inhibiting epithelial to mesenchymal transition in colon cancer with effects upon cancer aggressiveness

The last years of research in cancer treatment have been concentrated on the association between different chemotherapeutic regimens, or combinations of small molecules for dissimilar pathologies. However, limited progression has been made in the case of late stages patients, where the therapeutic efficiency is counterbalanced by the sizable malignant patterns and aggressive and heterogeneous phenotypes of cancer cells. The idea of finding a miRNA that can limit EMT and implicit the metastatic process could stand as a potent adjuvant therapy administrated in prior or in combination with current chemotherapeutic agents.

The presents study evaluated the therapeutic potential of miR-205-5p in colon cancer through analysis of EMT restriction upon expression restoration strategies. Although, the study of this miRNA has been approached in previous other investigations, the potential of miR-205-5p to act against EMT for inhibition of metastasis in colon cancer is still not completely clarified. Besides, the functional meaning of the miRNA sequence was connected to the clinical context in order to obtain knowledge about the translational role of miR-205 as a future therapeutic alternative for advanced forms of colon cancer.

Investigation of miR-205-5p expression confirmed the downregulated level in both TCGA and local cohorts of colon cancer patients. Survival statistics dependent on the status of miR-205-5p show that individuals with colon adenocarcinoma with high

expression of the present miRNA have a better prognosis in terms of survival days. After we corelated all the data in terms of signaling networks, we hypothesized that miR-205 could stand as a potent inhibitor of EMT through direct targeting of ZEB1 and indirect upregulation of CDH1 (E-cadherin).

In vitro treatment of colon cancer cells with miR-205-5p mimic in a minimal dose of 10 nM for 48h resulted in decreased levels of ZEB1 compared to control and cell treated with negative control, results that confirm the data obtained in other studies (3, 4). RT-qPCR and Western Blot also showed the upregulated expression of E-cadherin at both transcriptional and translational level. Functional evaluation highlights that HCT-116 cells treated with miR-205-5p are less invasive than the control counterparts and the modifications at molecular levels upon treatment are also translated into actual modification of cell behavior. Immunostaining and ultrastructural analysis confirmed the epithelial phenotype of colon cancer cells as well as the preponderancy of E-cadherin on the surface of cells together with tight adherence junctions between the membranes

Survival statistics show a marked difference between patients with high ZEB1 and low CDH1 and patients with low ZEB1 and high CDH1, where the second group presents a considerable better prognosis. Overall, data from patients sustains the therapeutic relevance of miR-205 in inhibiting EMT and implicit tumor metastasis in late stages patients together with prolongation of their survival time.

Study 3. MicroRNA-125b in colon cancer therapy – a mechanism dependent on TP53 status

The present study aimed at investigating the controversial role of miR-125b in colon cancer and elucidate the mechanisms behind its modulation. Specifically, we demonstrated that miR-125b therapy is context dependent (mainly corelated with TP53 status) and administration of these sequences should be done in an informed manner, keeping track of the patients' molecular status. Despite of a general downregulated profile in a large cohort of TCGA samples, miR-125b replacement is not necessarily favorable for all colon cancer individuals. At a more global level, this study highlights the importance of a systemic approach and wide target genes screening when studying the effects of miRNAs modulation.

When putting the miRNA profile of colon cancer cells into perspective, it is notable that miR-125b is largely decreased in CRC tissue, as supported by TCGA data. Not only so, but general scientific consensus confirms that miR-125b may be downregulated in many other cancer types as well, leading to increasing interest in its specific function (5, 6).

Surprisingly enough, TP53 levels seem to decrease both when adding miR-125b mimic and inhibitor. This contradictory data can be explained by two different

mechanisms: in the case of miR-125b mimic, direct miR-125b:TP53 complementary binding is presumably the cause. When the miR-125b level is decreased via exogenous inhibitor, consequent LIF increase can activate the LIF/STAT3 pathway which ultimately suppresses TP53 output. In short, TP53 level decreases in both instances, although there are two different mechanisms that drive this suppression.

Our findings support previous research in which miR-125b was shown to downregulate the expression of XIAP and Bcl-2. Thus, miR-125b manages to shift the balance of the apoptotic machinery towards apoptosis, further confirmed through optical and confocal microscopy. These examination techniques displayed a larger cell-free area in culture and dysmorphism of the nucleus and cytoskeleton in both cell lines. The increase of miR-125b is thus able to induce apoptosis by directly inhibiting XIAP and Bcl-2, two anti-apoptotic genes, which are frequently implicated in cancer resistance. Moreover, a noteworthy discrepancy is the increase of Bcl-2 in the HCT-116 cell line, as opposed to DLD-1, where it was significantly lower. This finding could be either attributed to the different cellular background of the cell lines, and as such requires further consideration.

Lastly, the results cast a shadow of doubt on the hypothesis that miR-125b may interact with and inhibit STAT3 (7). Considering the proportional correlation observed between miR-125b and STAT3 at post-transcriptional level, this not only disproves that miR-125b may decrease STAT3, but it may paradoxically increase it. As such, further analysis is required to elucidate the mechanism of action, possibly involving a separate pathway.

These data offer a novel perspective on the mechanism that drives miRNA dysregulation in cancer cells and provides a plausible explanation of the function of miR-125b. In conclusion, miRNAs could prove to be valuable candidates for adjuvant agents in cancer treatment, yet their cumulative effects on biological pathways require further study.

General conclusions and novelty

Together, these studies, present a different approach upon miRNA therapeutics. Considering their wide panel of target genes that can include both oncogenic and tumor suppressor genes for the same miRNA, these small non-coding RNAs are safer in limited doses with roles in just destabilizing the cancer cell.

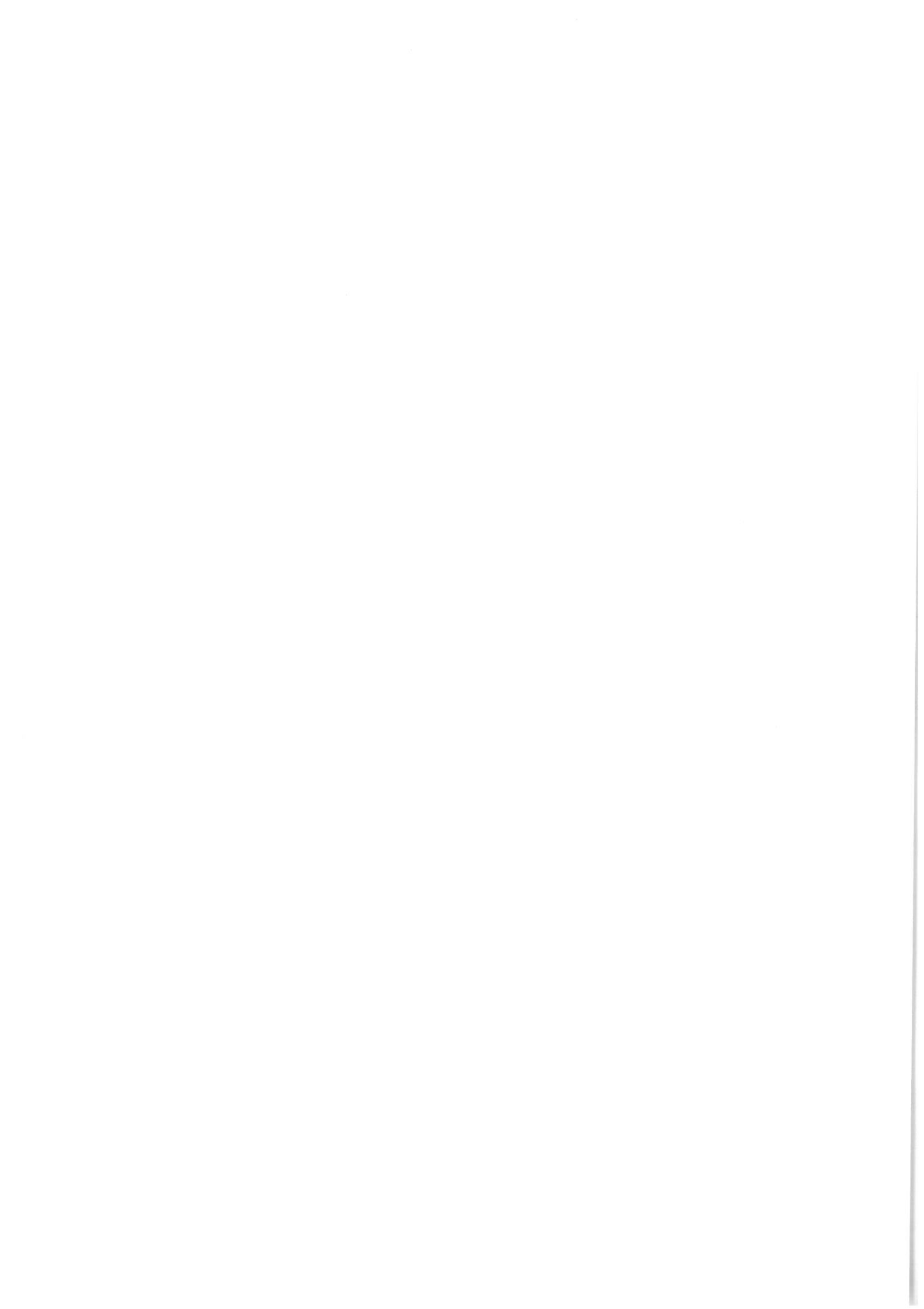
The present studies have several elements of innovation by their own and also taken together. The thesis presents a different approach on miRNA therapeutic, where the modulation of these transcripts is not used necessarily as a cure.

Specifically, we demonstrated for the first time the role of miR-205-5p in the impairment of epithelial to mesenchymal transition in colon cancer and why this non-coding RNA is associated with aggressive disease forms. Moreover, we proposed miR-205-5p as a limitative agent for late stages, where the therapeutic approaches are

frequently inefficient. Also, we elucidated the role of miR-125b in colon cancer where the literature is currently contradictory. We supposed that these opposite results are due to the heterogenous target genes of this miRNA and their mutational status. We focused on the interplay with TP53 and how the replacement therapy with miR-125b-5p can differ in respect with the integrity of the gene sequence. The replacement therapy is efficient only in the models with mutant TP53, where the gene acquires oncogenic potential and is inhibited by miR-125b. For a wild-type TP53, the same inhibitory action of the miRNA is favoring the malignant development due to limitation of activity of a tumor suppressor gene. These last effects are restricted until some point by concomitant inhibition of other anti-apoptotic genes (even so, the therapeutic efficiency is limitative). Lastly, we also obtained different results in the case of STAT3 gene that was described in the literature as a direct target of miR-125b. In colon cancer the modulation of STAT3 seems to be under a different mechanism and not through direct targeting.

SELECTIVE REFERENCES

1. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15524-9.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
3. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):593-601.
4. Zhang P, Wang L, Rodriguez-Aguayo C, Yuan Y, Debeb BG, Chen D, et al. miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13. *Nat Commun.* 2014;5:5671.
5. Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, Loureiro J, Baldaque I, Medeiros R, et al. miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *Biomed Res Int.* 2015;2015:304584.
6. Xu N, Zhang L, Meisgen F, Harada M, Heilborn J, Homey B, et al. MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *J Biol Chem.* 2012;287(35):29899-908.
7. Feng J, Fan Y, Ayiheng Q, Zhang H, Yong J, Hu B. MicroRNA-125b targeted STAT3 to inhibit laryngeal squamous cell carcinoma cell growth and motility. *Oncol Lett.* 2017;14(1):480-6.



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Noi strategii de diagnostic și terapie în cancer. Rolul ARN- urilor necodificatoare

Doctorand **Diana Gulei**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Ioana Neagoe**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. ARN-urile necodificatoare – de la biogeneză la reglarea căilor de semnalizare	19
1.1. Distribuția cantitativă a speciilor de ARN în celulă	19
1.2. Biogeneza ARN-urilor necodificatoare – microARN-urile	21
1.3. Rolul reglator al altor tipuri de ARN-uri necodificatoare	22
2. MicroARN-urile în cancer – cunoștințe actuale și perspective viitoare	25
2.1. Bazele dereglării microARN-urilor în cancer	26
2.1.1. Deleția sau amplificarea regiunilor miARN	26
2.1.2. Modificări în mecanismele transcripționale asociate cu dereglările miARN-urilor	26
2.1.3. Modificările epigenetice ale miARN-urilor	27
2.2. Expresia diferențială a miARN-urilor în cancer	28
2.3. Traficul miARN-urilor via exozomi în cancer	30
3. Implicarea microARN-urilor în principalele mecanisme maligne – apoptoza și metastazarea	35
3.1. Mecanismul de moarte celulară în cancer – rol în terapiile experimentale	35
3.1.1. Mecanismul apoptozei	36
3.1.2. MicroARN-uri cu rol în apoptoză	37
3.2. Invazia și metastazarea ca și răspuns al activării TEM în cancer	38
3.2.1. Mecanismul TEM	39
3.1.2. MiARN-uri cu rol în TEM	40
4. MicroARN-urile ca și elemente de terapie și diagnostic – abordări curente	43
4.1. miARN-uri cu potențial în testarea clinică	44
4.2. Strategiile terapeutice cu miARN-uri în cancer	45
4.2.1. Strategiile de livrare a miARN-urilor	45
4.2.2. Abordări inovatoare în modularea miARN-urilor – livrarea prin intermediul exozomilor și editarea cu CRISPR/Cas	46

CONTRIBUȚIE PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	51
2. Metodologie generală	51
3. Studiul 1 – Screening-ul microARN-urilor cu potențial terapeutic în malignitățile solide	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteză de lucru	54
3.3. Material și metodă	54
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	58
3.6. Concluzii	59
4. Studiul 2 – Restaurarea experimentală a miR-20505p inhibă tranziția epitelio-mezenchimală în cancerul de colon cu efecte asupra agresivității cancerului	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteză de lucru	62
4.3. Material și metodă	62
4.4. Rezultate	66
4.5. Discuții	89
4.6. Concluzii	90
5. Studiul 3 – MicroARN-125b în terapia cancerului de colon – mecanism dependent de statutul genei TP53	91
5.1. Introducere	91
5.2. Ipoteză de lucru	92
5.3. Material și metodă	92
5.4. Rezultate	94
5.5. Discuții	108
5.6. Concluzie	109
6. Discuții generale	111
7. Concluzii generale	113
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	115
REFERINȚE	117

Cuvinte cheie: cancer, microARN, terapie țintită, metastază, apoptoză, cercetare preclinică

INTRODUCERE

De la descoperirea inițială a dereglărilor microARN-urilor (miARN-urilor) în patologiile maligne (1), aceste mici secvențe necodificatoare au fost investigate intens. Numeroase grupuri au propus utilizarea lor ca instrumente de diagnostic și de prognostic minim invazive, în timp ce altele au subliniat potențialul rol ca ținte terapeutice în cancer. Aproximativ 17 ani mai târziu (de la primul manuscris despre capacitățile reglatoare ale miARN-urilor în cancer) și peste 100.000 de articole publicate la nivel global despre miARN-uri, aceste secvențe sunt încă departe de implementarea clinică. Prima și singura încercare a unui studiu clinic intervențional, (MRX34), a fost rapid retrasă după evidențierea unor efecte secundare agresive. Chiar dacă la ora actuală există 729 de studii clinice care implică miARN-uri, majoritatea sunt observaționale și includ evaluarea unor profile specifice necodificatoare asociate cu instalarea sau evoluția patologiei investigate (clinicaltrials.gov, search: miRNA, data: 29 decembrie 2018).

Deși surprinzător, evoluția lentă a miARN-urilor către sectorul clinic este justificată de rolurile modulatorie complexe, unde efectele sistemice în urma administrării sunt greu de cuantificat. Un singur miARN are câteva sute de gene țintă, iar un transcript mRNA poate fi vizat de numeroase miARN-uri. Prin urmare, chiar dacă abordarea clasică în termeni terapeutici constă în administrarea de secvențe de tip mimic pentru miARN-urile slab exprimate și inhibarea celor supraexprimate, această strategie nu este neapărat fezabilă. Un singur miARN poate afecta direct un număr mare de gene țintă, gene ce vor propaga în continuare efectele în cadrul semnalului din aval. Prin urmare, miARN ca agenți monoterapeutici în doze mari și repetitive în cancer pot defapt să activeze și căile oncogene în cadrul numeroaselor lor efecte, contracarând, cel puțin parțial, cele benefice. În ceea ce privește valoarea de diagnostic sau de prognostic, se întâlnește aceeași problemă. Datorită rolurilor moleculare complexe și heterogene, nivelul aceluiași miARN poate fi modificat în multiple condiții/patologii, precum o infecție bacteriană sau în cadrul unei patologii cu grad înalt de mortalitate precum cancerul. Mai mult, cum gestionăm pacienții ce au patologii suplimentare ce pot afecta nivelul circulator al unei semnături miARN?

Prezenta teză înfățișează o altă abordare privind terapia cu miARN-uri, unde aceste secvențe sunt de fapt utilizate ca sensibilizatori ale celulei canceroase datorită numeroaselor ținte, menite să crească eficiența celei de-a doua linii de tratament. De asemenea, oferim o perspectivă mecanistică asupra rolurilor modulatorie ale miRNA-urilor controversate pentru a evidenția importanța unei examinări atente a profilului molecular al pacientului înainte de administrarea secvențelor exogene necodificatoare. Așadar, în timp ce la unii pacienți un miARN specific poate fi benefic, pentru alții (cu aceeași patologie), aceiași miARN are efecte minime sau chiar negative.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Prima parte a tezei are scopul de a introduce cititorul în sectorul microARN-urilor în cancer și rolul acestora în modularea rețelelor de semnalizare extinse în interiorul celulei. Segmentul cunoașterii actuale este împărțit în patru capitole care au o orientare cronologică și o creștere contextuală în ceea ce privește complexitatea conținutului. Mai exact, primul capitol (ARN-urile necodificatoare – de la biogeneza la reglarea căilor de semnalizare) prezintă biogeneza ARN-urilor necodificatoare și, de asemenea, distribuția lor cantitativă în celulă, cu o perspectivă generală asupra rolului modulator al acestora; al doilea capitol (MicroARN-urile în cancer – cunoștințe actuale și perspective viitoare) cuprinde dereglarea microARN-urilor în celulele maligne și funcționalitatea lor în susținerea procesului de carcinogeneză; al treilea capitol (Implicarea microARN-urilor în principalele mecanisme maligne – apoptoza și metastazarea) este asociat rolului microARN-urilor în apoptoză și metastazare, cele două mecanisme principale ce au fost abordate în teza de doctorat și, în sfârșit, capitolul patru (MicroARN-urile ca și elemente de terapie și diagnostic – abordări curente) cu principalele strategii terapeutice ce implică microARN-uri în cancer.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Prezenta teză este împărțită în trei studii principale, ce au ca scop identificarea miARN-urilor cu potențiale roluri terapeutice în malignitățile solide (cu accent ulterior asupra cancerului de colon).

Studiul 1. Screening-ul microARN-urilor cu potențial terapeutic în malignitățile solide

În ciuda progreselor semnificative în cercetarea cancerului, această patologie este clasificată în continuare drept una dintre cele mai letale boli, cu modificări minime ale incidenței și mortalității în ultimii ani. Aceste date statistice sunt determinate în principal de diagnosticul târziu, unde formele tumorale avansate sunt adesea dificil de tratat și de asemenea asociate cu instalarea rezistenței la tratament prin activarea mecanismelor compensatorii. Potrivit bazei de date Globocan, cancerul mamar, colorectal și cel de vezică se numără printre malignitățile de vârf atât în ceea ce privește incidența, cât și procentul de mortalitate (2).

Prezentul studiu a urmărit selectarea miARN-urilor adecvate ce ar putea fi utilizate în strategiile terapeutice experimentale, împreună cu malignitatea solidă asociată unui profil necodificator patologic. Am examinat trei tipuri de tumori solide (cancer mamar, colorectal și vezică urinară), unde opțiunile actuale de tratament sunt

limitate, fapt demonstrat de ratele de mortalitate aferente. Cele două miARN-uri principale examinate în studiu constau în miR-205-5p și miR-125b-5p; aceste două secvențe au fost asociate anterior cu expresie aberantă în cancer și, de asemenea, cu mecanisme cheie precum tranziția epitelio-mezenchimală (TEM) respectiv, apoptoza.

Specific, am analizat trei malignități solide distincte pentru expresia miR-205-5p și miR-125b-5p prin încorporarea țesutului tumoral și a controalelor asociate (țesut normal adiacent). Tendința generală asociată cu aceste secvențe este reprezentată de un profil de expresie inhibat. Cu toate acestea, în cancerul de vezică, miR-205-5p a fost găsit ca fiind supraexprimat, arătând rolul dependent de context al acestui transcript necodificator. În cazul cancerului mamar, ambele miARN-uri sunt semnificativ subexprimate, cu un profil mai omogen pentru miR-205-5p; inhibarea miR-125b-5p este obținută în principal din cauza prezenței unor probe de tip *outliner* în cadrul analizei. Același model a fost găsit în cohortele de adenocarcinom de colon, dar cu un profil mai omogen în țesutul tumoral, unde ambele miARN-uri se clasează la un nivel minim de exprimare în fiecare probă. Având în vedere aceste date, am concluzionat că miR-205-5p și miR-125b ar putea deține funcții supresoare tumorale relevante în cancerul de colon, unde strategiile de înlocuire ar putea influența fenotipul celulelor canceroase.

Study 2. Restaurarea experimentală a miR-205-5p inhibă tranziția epitelio-mezenchimală în cancerul de colon cu efecte asupra agresivității cancerului

Ultimii ani de cercetare în tratamentul cancerului s-au concentrat pe asocierea dintre diferite regimuri chimioterapeutice sau combinații de molecule mici pentru sensibilizarea crescută a celulelor tumorale. Cu toate acestea, progrese limitate au fost observate în cazul pacienților aflați în stadii tardive, unde eficiența terapeutică este contrabalansată de modelele maligne și fenotipurile agresive și heterogene ale celulelor canceroase. Ideea găsirii unui miARN ce poate limita TEM și implicit procesul de metastazare ar putea duce la conturarea unor terapii adjuvante administrate anterior sau în combinație cu agenții chimioterapeutici curenți.

Studiul prezentat a evaluat potențialul terapeutic al miR-205-5p în cancerul de colon prin analiza restricției TEM în urma strategiilor de restaurare a expresiei. Deși acest miARN a fost abordat în alte studii anterioare, potențialul miR-205-5p de a acționa împotriva TEM pentru inhibarea metastazării în cancerul de colon nu este încă clarificat complet. În plus, funcționalitatea miARN-ului a fost determinată în context clinic pentru a obține cunoștințe despre rolul translațional al miR-205 ca o alternativă terapeutică viitoare pentru forme avansate de cancer de colon.

Investigarea expresiei miR-205-5p a confirmat nivelul scăzut de exprimare, atât în baza de date TCGA, cât și în cohorta locală de pacienți cu cancer de colon. Statisticile de supraviețuire în funcție de nivelul miR-205-5p arată că persoanele cu adenocarcinom de colon cu expresie ridicată a miARN-ului prezintă un prognostic mai bun în ceea ce privește zilele de supraviețuire. După corelarea datelor afiliate rețelelor de semnalizare, am emis ipoteza că miR-205-5p ar putea fi un inhibitor puternic al TEM prin modularea directă a ZEB1 și reglarea indirectă a CDH1 (E-cadherin).

Tratamentul *in vitro* al celulelor de cancer de colon cu miR-205-5p mimic într-o doză minimă de 10 nM timp de 48 de ore a determinat scăderea nivelului de ZEB1 comparativ cu martorul și celulele tratate cu control negativ, rezultate ce confirmă datele obținute în alte studii (3, 4). RT-qPCR și Western Blot au arătat, de asemenea, expresia crescută a E-cadherinei la nivel transcripțional și translațional. Evaluarea funcțională evidențiază faptul că celulele HCT-116 tratate cu miR-205-5p sunt mai puțin invazive decât omologii din control și modificările la nivel molecular după tratament sunt de asemenea traduse în modificări în comportamentul celular. Marcarea imună și analiza ultrastructurală au confirmat fenotipul epitelial al celulelor de cancer de colon, precum și preponderența E-cadherinei pe suprafața celulelor, împreună cu joncțiunile de aderență între membrane.

Statisticile de supraviețuire arată o diferență semnificativă între pacienții cu ZEB1 crescut și cei cu CDH1 scăzut și pacienții cu ZEB1 scăzut și CDH1 crescut, în care al doilea grup prezintă un prognostic considerabil mai bun. În ansamblu, datele de la pacienți susțin relevanța terapeutică a miR-205 în inhibarea TEM și a metastazelor tumorale implicate în stadiile târzive împreună cu prelungirea timpului de supraviețuire.

Study 3. MicroARN-125b în terapia cancerului de colon – mecanism dependent de statutul genei TP53

Prezentul studiu a urmărit să investigheze rolul controversat al miR-125b în cancerul de colon și să elucideze mecanismele ce stau la baza modulării sale experimentale. În mod specific, am demonstrat că terapia cu miR-125b este dependentă de context (corelată în principal cu statutul TP53), iar administrarea acestor secvențe trebuie făcută în mod informat, urmărind statutul molecular al pacienților. În ciuda unui profil general inhibat într-o cohorta mare de probe TCGA, înlocuirea miR-125b nu este neapărat favorabilă pentru toți indivizii cu cancer de colon. La un nivel mai global, acest studiu evidențiază importanța unei abordări sistemice și a unei examinări extinse a genelor țintă atunci când se studiază efectele modulării miARN-urilor.

Profilul miARN al celulelor cancerului de colon în perspectivă susține un profil inhibat al miR-125b în țesutul de cancer de colon, așa cum susțin datele TCGA.

Consensul științific general confirmă faptul că miR-125b poate fi inhibat în mai multe tipuri de cancer, ducând la creșterea interesului pentru funcția sa specifică (5, 6).

În mod surprinzător, nivelurile TP53 scad în ambele variante terapeutice: miR-125b mimetic și inhibitor. Aceste date contradictorii pot fi explicate prin două mecanisme diferite: în cazul miR-125b mimetic, este posibil ca legarea complementară miR-125b: TP53 să fie provocată. Atunci când nivelul miR-125b este scăzut prin intermediul inhibitorului exogen, creșterea LIF poate activa calea LIF/STAT3 care în cele din urmă suprimă producția TP53. Pe scurt, nivelul TP53 scade în ambele cazuri, deși există două mecanisme diferite care conduc această suprimare.

Constatarile noastre susțin cercetările anterioare în care miR-125b a fost demonstrat ca și inhibitor al expresiei XIAP și Bcl-2. Astfel, miR-125b reușește să schimbe echilibrul mecanismului apoptotic spre apoptoză, fapt confirmat prin microscopie optică și confocală. Aceste tehnici de examinare au prezentat o zonă mai largă zone extinse fără celule în cultură și dismorfisme ale nucleului și citoscheletului în ambele linii celulare. Creșterea miR-125b este astfel capabilă să inducă apoptoză prin inhibarea directă a XIAP și Bcl-2, două gene anti-apoptotice, care sunt frecvent implicate în rezistența la terapie. Mai mult decât atât, o discrepanță remarcabilă este creșterea Bcl-2 în linia celulară HCT-116, spre deosebire de DLD-1, unde a fost semnificativ mai mică. Această constatare ar putea fi atribuită backgroundului genetic diferit al liniilor celulare și, ca atare, necesită o analiză suplimentară.

În cele din urmă, rezultatele pun la îndoială ipoteza că miR-125b poate interacționa cu și inhiba STAT3 (7). Având în vedere corelația proporțională observată între miR-125b și STAT3 la nivel post-transcripțional, aceasta nu numai că dezmente faptul că miR-125b poate scădea STAT3, ci defapt poate crește nivelul genei. Ca atare, este necesară o analiză suplimentară pentru a elucida mecanismul de acțiune.

Aceste date oferă o perspectivă nouă asupra mecanismului ce conduce la dereglarea miARN-urilor în celulele canceroase și oferă o explicație plauzibilă a funcției miR-125b. În concluzie, miARN-urile s-ar putea dovedi a fi candidați valoroși ca adjuvanți în tratamentul cancerului, totuși efectele lor cumulative asupra căilor biologice necesită un studiu suplimentar.

Concluzii generale și noutatea studiului

Împreună, aceste studii prezintă o abordare diferită asupra terapiei cu miARN-uri. Având în vedere panoul lor larg de gene țintă ce poate include atât gene oncogene, cât și supresoare tumorale pentru același miARN, aceste mici ARN-uri necodificatoare sunt mai sigure în doze minime cu roluri în destabilizarea celulei canceroase la nivel global.

Studiile de față au multiple elemente de noutate pe cont propriu și, de asemenea, luate împreună. Teza prezintă o abordare diferită pentru terapia cu miARN,

în care modularea acestor transcriptiți nu este folosită neapărat ca opțiune de mono-tratament.

În mod specific, am demonstrat pentru prima dată rolul miR-205-5p în deprecierea tranziției epitelio-mezenchimale în cancerul de colon și cauzalitatea asocierii acestui miARN cu forme agresive ale bolii. Mai mult decât atât, am propus miR-205-5p ca agent limitant în stadiile târzii, unde abordările terapeutice sunt adesea ineficiente. De asemenea, am elucidat rolul miR-125b în cancerul de colon, unde literatura este în prezent contradictorie. Am presupus că aceste rezultate opuse se datorează genelor țintă heterogene ale acestui miARN și statusului lor mutațional. Ne-am concentrat asupra interacțiunii cu TP53 și asupra modului în care terapia de substituție cu miR-125b-5p poate fi diferită în funcție de integritatea secvenței genei. Terapia de substituție este eficientă numai în modelele cu TP53 mutant, unde gena capătă potențial oncogen și este inhibată de miR-125b. Pentru un TP53 de tip wildtype, aceeași acțiune inhibitoare a miARN favorizează dezvoltarea malignă datorită limitării activității unei gene supresoare tumorale. Aceste efecte ulterioare sunt restricționate până la un anumit punct prin inhibarea concomitentă a altor gene anti-apoptotice. În cele din urmă, am obținut de asemenea rezultate diferite în cazul genei STAT3 care a fost descrisă în literatură ca o țintă directă a miR-125b. În cancerul de colon, modularea STAT3 pare să fie sub influența unui mecanism diferit și nu prin direcționare directă.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
3. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):593-601.
4. Zhang P, Wang L, Rodriguez-Aguayo C, Yuan Y, Debeb BG, Chen D, et al. miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13. *Nat Commun*. 2014;5:5671.
5. Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, Loureiro J, Baldaque I, Medeiros R, et al. miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *Biomed Res Int*. 2015;2015:304584.
6. Xu N, Zhang L, Meisgen F, Harada M, Heilborn J, Homey B, et al. MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29899-908.
7. Feng J, Fan Y, Ayiheng Q, Zhang H, Yong J, Hu B. MicroRNA-125b targeted STAT3 to inhibit laryngeal squamous cell carcinoma cell growth and motility. *Oncol Lett*. 2017;14(1):480-6.

