
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Controlul apoptozei în cancer prin compuși fitochimici naturali. Rolul microARN/siARN

Doctorand **Liviuța Petrișor (căș. Budișan)**

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. Compușii fitochimici	19
1.1. Activitatea compușilor fitochimici determinată de structura lor	19
1.2. Beneficiile antioxidante ale compușilor fitochimici	20
1.3. Compușii fitochimici și cancerul	20
1.3.1. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	21
1.3.2. Morin (3, 2, 4, 5, 7, pentahydroxyflavone)	22
1.3.3. CAPE (fenetil ester al acidului cafeic)	22
1.3.4. Campferol	23
1.3.5. Genisteina (GEN)	23
2. Modularea miARN de către compușii fitochimici	23
2.1. Apoptoza	23
2.2. MicroARN și ARN de interferență (ARNi)	24
2.3. Implicațiile compușilor biologic activi în patologia tumorală	25
2.3.1. Modularea miARN de către EGCG	27
2.3.2. Modularea miARN de către Morin și Campferol	28
2.3.3. Modularea miARN de către CAPE	28
2.3.4. Modularea miARN de către Genisteină	28
3. ARN necodificatoare lungi, ca ținte ale compușilor fitochimici naturali	31
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	35
2. Metodologie generală	35
3. Studiul 1 – Investigarea <i>in vitro</i> a eficienței unui panel de compuși fitochimici naturali cu potențial rol terapeutic în cancerul de colon	37
3.1. Introducere	37
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	38
3.3. Material și metodă	38

3.3.1. Compușii testați	38
3.3.2. Culturi celulare	38
3.3.3. Tratamente celulare	39
3.3.4. Măsurarea ratei de proliferare celulară - testul MTT	39
3.3.5. Evaluarea ciclului celular	40
3.3.6. Evaluarea invaziei celulare	40
3.3.7. Apoptoza	40
3.3.8. Autofagia	40
3.3.9. Microscopia cu contrast de fază	41
3.3.10. Microscopia confocală	41
3.3.11. Microscopia de fluorescență în câmp întunecat	41
3.4. Rezultate	41
3.4.1. Evaluarea viabilității celulelor de cancer de colon după tratamentul cu compuși naturali în doze diferite	41
3.4.2. Evaluarea ciclului celular pentru liniile celulare RKO și HCT - 116 tratate cu Cape, Morin și Campferol	45
3.4.3. Evaluarea invaziei celulare pentru liniile celulare RKO și HCT - 116 tratate cu Cape, Morin și Campferol	47
3.4.4. Apoptoză și autofagie la tratamentul cu Cape și Campferol	49
3.4.5. Microscopia în câmp luminos și câmp întunecat	52
3.4.6. Microscopia confocală	53
3.5. Discuții	54
3.6. Concluzii	55
4. Studiul 2 - Identificarea efectului compușilor fitochimici naturali asupra expresiei genice și validarea efectului terapeutic la nivel transcriptomic în cancerul de colon	57
4.1. Introducere	57
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	58
4.3. Material și metodă	58
4.4. Rezultate	58
4.5. Discuții	81
4.6. Concluzii	81
5. Studiul 3 - Analiza efectului mutațional al compușilor fitochimici cu implicații în cancerul de colon, prin intermediul secvențierii de nouă generație	83
5.1. Introducere	83
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	84
5.3. Material și metodă	84
5.4. Rezultate	84
5.5. Discuții	86
5.6. Concluzii	86

6. Studiul 4 - Evaluarea funcțională a pachetului de gene diferit exprimate între grupul tratat cu CAPE și Campferol și grupul control pe liniile celulare de cancer de colon RKO și HCT 116 - rolul miARN/siARN în reglarea proceselor biologice	87
6.1. Introducere	87
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	87
6.3. Material și metodă	88
6.4. Rezultate	88
6.5. Discuții	92
6.6. Concluzii	93
7. Discuții generale	95
8. Concluzii generale	97
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: compuși fitochimici, miARN, cancer de colon, CAPE, Morin, Campferol.

INTRODUCERE

Apariția și progresia cancerului sunt rezultate ale unui fond genetic alterat, care permit validarea genotipului și fenotipului celulelor tumorale printr-un proces multietapizat format din următoarele etape: supraviețuirea (imortalitate celulară), proliferarea necontrolată, invazia organelor adiacente, neoangiogeneza și metastazarea(1, 2). Identificarea și analiza mecanismelor implicate în aceste procese, pot să contribuie la dezvoltarea unor noi strategii terapeutice în cancer, în particular pentru cancerul de colon și sân.

Compușii fitochimici naturali au fost utilizați în prevenirea și terapia cancerului în medicina tradițională datorită siguranței lor, neavând efecte secundare și datorită biodisponibilității lor. Prin urmare, efectele benefice ale compușilor fitochimici sunt de mare interes, fiind demonstrat că au un impact benefic asupra sănătății umane, datorită capacității lor de a modula expresia genelor, microARN, ARN necodificatoare sau unele procese epigenetice (3).

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii are la bază evidențierea rezultatelor cercetărilor din ultimii ani cu privire la rolul compușilor fitochimici în cancer. Primul capitol- **Compușii fitochimici**, cuprinde o prezentare succintă a principalilor compuși fitochimici cu rol în prevenția cancerului precum și a relației dintre structura acestora și activitatea lor. Intervenția fitochimică în chimioterapie este susținută de un număr mare de studii clinice (4-6) care au arătat că acești compuși cresc eficiența tratamentului și reduc efectele sale secundare, induc apoptoza în celulele canceroase, reduc rezistența la tratament și severitatea comorbidității (7). Capitolul al doilea intitulat-**Modularea miARN de către compușii fitochimici**, se axează pe evidențierea studiilor cu privire la efectele compușilor fitochimici asupra expresiei microARN supresoare de tumori și microARN oncogene. În ultimul capitol sunt prezentate studii recente referitoare la potențialul rol al lncARN de reglare a căilor supresoare de tumori și a celor oncogenice, conducând la implementarea de diferite strategii terapeutice orientate pe aceste secvențe (8, 9).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Teza de doctorat este structurată pe patru studii principale având ca scop identificarea de noi biomarkeri pentru prevenția și tratamentul cancerului de colon cât și posibilitatea folosirii acestora în terapii personalizate.

Studiul 1 - Investigarea *in vitro* a eficienței unui panel de compuși fitochimici naturali cu potențial rol terapeutic în cancerul de colon

În studiul de față am investigat rolul *in vitro* al compușilor naturali în inhibarea cancerului de colon, unul din cancerele de vârf în ceea ce privește incidența și mortalitatea. În mod specific, am testat activitatea CAPE, Campferol, Morin, EGCG, Daizenină și Genisteină la viabilitatea celulelor și am continuat testul funcțional pentru CAPE, Campferol și Morin.

Toți compușii testați au avut efecte inhibitoare în ceea ce privește viabilitatea celulară, efect dependent de doză. Evaluarea ciclului celular a arătat că acești compuși naturali au capacitatea de a opri ciclul celular, cu o preponderență a populației celulare tratate în faza G1, comparativ cu probele de control. Morin a prezentat cele mai pronunțate efecte asupra liniei celulare RKO, în timp ce CAPE a avut cel mai puternic efect în termeni de oprire a ciclului celular în celulele HCT-116. În ceea ce privește

invazia celulară, tratamentul CAPE a limitat parametrii de migrare în celulele tratate în comparație cu cele control; în schimb efecte minime s-au observat pentru ceilalți doi compuși: Campferol și Morin.

În cele din urmă, CAPE și Campferol au fost utilizați pentru analiza exprimării genei (codificatoare și non codificatoare) în celulele tratate comparativ cu cele de control.

CAPE și Campferol au avut un efect inhibitor asupra liniilor celulare de cancer de colon RKO și HCT-116, atât CAPE cât și Campferol inhibă proliferarea, motilitatea și invazia celulară și stimulează apoptoza și autofagia și ar putea fi utilizați în viitor pentru a dezvolta noi strategii terapeutice alternative sau pentru a completa tratamentul convențional pentru acest tip de malignitate. Mai mult, acești compuși ar putea fi utilizați și ca agenți preventivi, pentru întârzierea sau inhibarea instalării cancerului.

Studiul 2 - Identificarea efectului compușilor fitochimici naturali asupra expresiei genice și validarea efectului terapeutic la nivel transcriptomic în cancerul de colon

Acest studiu se concentrează pe analiza la nivel de transcriptom a schimbărilor moleculare ce intervin în urma tratării liniilor celulare de cancer de colon, HCT-116 și RKO, cu cei doi compuși naturali selectați: CAPE și Campferol. Aceste schimbări la nivel de mRNA în profilul de gene codificatoare și necodificatoare subliniază specificitatea, cât și complexitatea modalității de acțiune a polifenolilor în inhibarea cancerului, dar și posibilitatea folosirii acestora în terapii personalizate.

În urma studiilor de microarray asupra CAPE și Campferol rezultă că cei doi compuși fitochimici au un efect inhibitor asupra liniilor celulare de cancer de colon RKO și HCT-116, atât CAPE cât și Campferol modulează expresia genelor supraexprimate și subexprimate, aceștia având rol de supresor tumoral prin inducerea apoptozei și ar putea fi utilizați în viitor pentru a dezvolta noi strategii terapeutice alternative sau pentru a completa tratamentul convențional pentru cancerul de colon. Mai mult, acești compuși ar putea fi utilizați și ca agenți preventivi, pentru întârzierea sau inhibarea instalării cancerului. Aceste modificări survenite în urma tratării celulelor de cancer de colon, cât și specificitatea lor, demonstrează un mecanism de acțiune complex asociat compușilor naturali ce ar putea fi exploatat în terapii personalizate. Cu toate acestea, heterogenitatea profilului transcriptomic evidențiază necesitatea unor studii de lungă durată pentru stabilirea efectelor adverse ce ar putea interveni în urma modificării unui profil atât de complex de gene.

Studiul 3 - Analiza efectului mutațional al compușilor fitochimici cu implicații în cancerul de colon, prin intermediul secvențierii de nouă generație

Studiul 3 are ca și scop investigarea capacității compușilor naturali CAPE și Campferol de a modifica profilul mutațional al liniilor celulare de cancer de colon – HCT-116 și RKO – la nivel de ADN în urma tratamentului *in vitro* timp de 48 de ore prin intermediul secvențierii de nouă generație.

Pentru a investiga profunzimea activității compușilor fitochimici naturali, liniile celulare RKO și HCT-116 au fost secvențiate la nivelul de ADN după 48 de ore de expunere la Cape și Campferol în comparație cu celulele martor care nu au primit nici un tip de tratament.

S-a observat că liniile tratate cu CAPE și Campferol nu mai prezintă mutații patogene.

Constatările noastre indică faptul că, CAPE și Campferol au capacitatea de a influența în mod negativ dezvoltarea și progresul cancerului de colon *in vitro* prin modificarea specifică a celulelor la nivel molecular; această activitate poate fi exploatată în posibile terapii adjuvante folosind concentrația optimă a dozei cu efecte secundare minime, dar cu activitate inhibitoare a cancerului *in vivo*.

Studiul 4 - Evaluarea funcțională a pachetului de gene diferit exprimate între grupul tratat cu CAPE și Campferol și grupul control pe liniile celulare de cancer de colon RKO și HCT 116 - rolul miARN/siARN în reglarea proceselor biologice

Acest studiu se bazează pe elucidarea rolului miARN/siARN în reglarea proceselor translaționale.

Când apar modificări într-o rețea transcripțională, nu este important doar să știm care sunt cele mai modificate gene în ceea ce privește nivelul expresiei genelor, ci și care sunt cele mai relevante modificări în contextul rețelei. Este important să identificăm interconexiunile între genele alterate între două condiții biologice, indentificarea unor miARN-uri centrale, în aceste rețele poate fi văzută ca un potențial biomarker de prognostic sau terapeutic, ținând cont că modificarea unui miARN, poate avea un impact mare asupra țintelor terapeutice, decât prin țintirea unei singure gene. Eficiența terapeutică a unei doze unice de siARN sau miARN depinde de o serie de factori. Acestea includ stabilitatea moleculelor de ARN, gradul de eliberare de pe suprafața sau din interiorului nanositemului terapeutic, precum și timpul de înjumătățire și viteza de resinteză a proteinelor țintă (half-life și “turnover rate”). O mai bună înțelegere a mecanismelor de acțiune pot contribui la dezvoltarea de noi strategii terapeutice folosind siARN sau miARN.

În urma tratării liniilor de cancer de colon, RKO și HCT 116 cu compuși fitochimici naturali, CAPE și Campferol urmată de analiza microarray, s-a observat apariția proceselor biologice alterate.

Datele noastre furnizează un model de expresie, coordonate funcțional de diferite familii de gene interconectate cu miARN-urile care pot avea noi ținte terapeutice pentru tratarea cancerului. Aici trebuie să se pună în balanță specificitatea mare dată de siARN pentru o anumită genă, sau capacitatea miARN de a ținti simultan mai multe gene, care pot fi în unele cazuri nespecifice.

Concluzii generale și noutatea studiului

În urma studiilor funcționale *in vitro* asupra CAPE și Campferol, s-a constatat că cei doi compuși fitochimici au un efect inhibitor asupra liniilor celulare de cancer de colon RKO și HCT-116 și ar putea fi utilizați în viitor pentru a dezvolta noi strategii terapeutice alternative sau pentru a completa eficiența regimurilor convenționale de tratament pentru această malignitate. Mai mult, acești compuși ar putea fi de asemenea utilizați ca agenți preventivi pentru întârzierea sau inhibarea formării cancerului. În orice caz, aspecte importante despre efectele *in vivo*, cum ar fi eficiența dozei, efectele asupra celulelor sănătoase, modificările la nivel molecular, biodisponibilitatea și expunerea pe termen lung trebuie abordate înainte de formularea unor criterii coerente pentru strategii terapeutice.

Prezentul studiu de doctorat conține elemente de noutate atât în cadrul studiilor individuale, cât și ca cercetare de ansamblu privind efectul terapeutic al compușilor fitochimici naturali în cancerul de colon.

Specific, cercetarea *in vitro* a demonstrat capacitatea compușilor fitochimici naturali, respectiv CAPE și Campferol de a modula extins profilul de gene codificatoare și gene necodificatoare lungi, însă într-un mod diferențiat în funcție de linia celulară de cancer de colon și de tratamentul aplicat.

De asemenea s-a demonstrat eficiența acestora de a elimina mutații patogene la nivel de ADN cu efect inhibitor asupra proliferării celulelor de cancer de colon. Acest aspect reprezintă un element important în formularea de strategii terapeutice ținând cont de capacitatea celulelor maligne de a dezvolta mutații pentru a dobândi rezistență la tratament.

În ansamblu, cercetarea doctorală aduce date experimentale noi privind acțiunea compușilor fitochimici naturali în cancerul de colon, date ce contribuie la dezvoltarea sectorului preventiv și terapeutic în cazul medicinei alternative.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Hainaut P, Plymoth A. Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy. *Current opinion in oncology*. 2013;25(1):50-1.
3. Cojocneanu Petric R, Braicu C, Raduly L, Zanoaga O, Dragos N, Monroig P, et al. Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone-related cancers. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:2053-66.
4. R. Karimi1 * KP, N. Hayati Roudbari1, S. Vakili Sadeghi1, M. Hashemi2, P. Hayat3. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of morin in human Leukemia cell lines (HUT-78). *International Journal of Cellular & Molecular Biotechnology*. 2013;2013(2013):13.
5. Hsiang CY, Wu SL, Ho TY. Morin inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hepatocellular transformation via activator protein 1 signaling pathway and cell cycle progression. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(11):1603-11.
6. Kuo HM, Chang LS, Lin YL, Lu HF, Yang JS, Lee JH, et al. Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. *Anticancer research*. 2007;27(1A):395-405.
7. Kawabata K, Tanaka T, Honjo S, Kakumoto M, Hara A, Makita H, et al. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1999;83(3):381-6.
8. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer discovery*. 2011;1(5):391-407.
9. Liu G, Zheng X, Xu Y, Lu J, Chen J, Huang X. Long non-coding RNAs expression profile in HepG2 cells reveals the potential role of long non-coding RNAs in the cholesterol metabolism. *Chinese medical journal*. 2015;128(1):91-7.

PhD THESIS SUMMARY

Control of apoptosis in cancer by natural phytochemical compounds. The role of microARN/siARN

PhD Student **Liviuța Petrișor (căs. Budișan)**

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



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Phytochemical compounds	19
1.1. The activity of the phytochemical compounds determined by their structure	19
1.2. Phytochemicals antioxidant benefits	20
1.3. Phytochemical compounds and cancer	20
1.3.1. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	21
1.3.2. Morin (3, 2, 4, 5, 7, pentahydroxyflavone)	22
1.3.3. CAPE (Caffeic acid phenethyl ester)	22
1.3.4. Kaempferol	23
1.3.5. Genistein (GEN)	23
2. Modulation of miRNA by phytochemical compounds	23
2.1. Apoptosis	23
2.2. MicroRNA and RNA interference (RNAi)	24
2.3. Implication of biologically active compounds in tumor pathology	25
2.3.1. miRNA modulation by EGCG	27
2.3.2. miRNA modulation by Morin and Kaempferol	28
2.3.3. miRNA modulation by CAPE	28
2.3.4. miRNA modulation by Genistein	28
3. Long non-coding RNA as targets of natural phytochemical compounds	31
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis / objectives	35
2. General methodology	35
3. Study 1 - The effectiveness in vitro investigation of a natural phytochemical compounds panel with potential therapeutic role in colon cancer	37
3.1. Introduction	37
3.2. Working hypothesis / objectives	38
3.3. Material and method	38
3.3.1. Compounds tested	38

3.3.2. Cell cultures	38
3.3.3. Cell treatments	39
3.3.4. Cell proliferation-MTT test	39
3.3.5. Cell cycle evaluation	40
3.3.6. Cell invasion evaluation	40
3.3.7. Apoptosis	40
3.3.8. Autophagy	40
3.3.9. Phase contrast microscopy	41
3.3.10. Confocal microscopy	41
3.3.11. Fluorescence microscopy in dark field	41
3.4. Results	41
3.4.1. Evaluation of the colon cancer cells viability after natural compounds treatment at different dose	41
3.4.2. Cell cycle evaluation for RKO and HCT-116 cell lines treated with CAPE, Morin and Kaempferol	45
3.4.3 Cellular invasion assessment for RKO and HCT-116 cell lines treated with CAPE, Morin and Kaempferol	47
3.4.4. Apoptosis and autophagy in CAPE and Kaempferol treatment	49
3.4.5. Microscopy in bright field and dark field	52
3.4.6. Confocal microscopy	53
3.5. Discussions	54
3.6. Conclusions	55
4. Study 2 - Identification of natural phytochemical compounds effect on gene expression and validation of therapeutic effect at transcriptomic level in colon cancer	57
4.1. Introduction	57
4.2. Working hypothesis / objectives	58
4.3. Material and method	58
4.4. Results	58
4.5. Discussions	81
4.6. Conclusions	81
5. Study 3 - Analysis of the phytochemical compounds mutagenic effect with implications in colon cancer through new generation sequencing	83
5.1. Introduction	83
5.2. Working hypothesis / objectives	84
5.3. Material and method	84
5.4. Results	84
5.5. Discussions	86
5.6. Conclusions	86
6. Study 4 - Functional evaluation of the different gene package	87

expressed between the CAPE and Kaempferol group and the control group on colon cancer cell lines RKO and HCT 116 - the role of miRNA/ siRNA in biological processes regulation

6.1. Introduction	87
6.2. Working hypothesis / objectives	87
6.3. Material and method	88
6.4. Results	88
6.5. Discussions	92
6.6. Conclusions	93
7. General discussions	95
8. General conclusions	97
9. Originality and thesis innovative contributions	99
REFERENCES	101

Key words: phytochemicals compounds, miRNA, colon cancer, CAPE, Morin, Kaempferol

INTRODUCTION

The emergence and progression of cancer are the results of a genetically altered background that allows the genotyping and phenotype of tumor cells to be validated by a multi-stage process consisting of the following stages: survival (cell immortality), uncontrolled proliferation, invasion of adjacent organs, neoangiogenesis and metastasis (1, 2). Identifying and analyzing the mechanisms involved in these processes can contribute to the development of new therapeutic strategies in cancer, particularly colon and breast cancer.

Natural phytochemical compounds have been used to prevent and treat cancer in traditional medicine because of their safety, with no side effects and their bioavailability. Therefore, the beneficial effects of phytochemical compounds are of great interest, being shown to have a great impact on human health, due to their ability to modulate gene expression, microRNA, non-coding RNA or some epigenetic processes (3).

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The current state of knowledge is based on highlighting the research results in recent years regarding the role of phytochemical compounds in cancer. The first chapter-**Phytochemical compounds** contains a brief presentation of the main phytochemical compounds with role in cancer prevention as well as the relationship between their structure and their activity. Phytochemical intervention in chemotherapy is sustained by a large number of clinical studies (4-6) which have demonstrated that these compounds increase treatment efficiency and reduce its side effects, induce apoptosis in cancer cells, reduce treatment resistance and comorbidities severity (7). The second chapter-**Modulation of miRNA by phytochemical compounds** focuses on highlighting studies regarding the effects of phytochemical compounds on microRNA tumor suppressor expression and oncogenic microRNA. The last chapter presents recent studies on the potential role of lncRNA in regulating tumor suppressor and oncogenic pathways, leading to the implementation of different therapeutic strategies targeted to these sequences (8, 9).

PERSONAL CONTRIBUTION

The PhD thesis is structured in four main studies focused on the identification of new biomarkers for colon cancer prevention and treatment and the possibility of their use in personalized therapies.

Study 1 - The effectiveness *in vitro* investigation of a natural phytochemical compounds panel with potential therapeutic role in colon cancer

In this study we investigated the *in vitro* role of natural compounds in colon cancer inhibition, one of the leading cancers in terms of incidence and mortality. Specifically, we tested CAPE, Kaempferol, Morin, EGCG, Daizenine and Genistein activity on cell viability and continued the functional test for CAPE, Kaempferol and Morin.

All compounds tested had inhibitory effects on cell viability in dose-dependent manner. Cell cycle evaluation has revealed that these natural compounds have the ability to stop the cell cycle, with a preponderance of the G1-treated cell population compared to control samples. Morin presented the most pronounced effects on the RKO cell line, while CAPE had the strongest effect in terms of stopping the cell cycle on

HCT-116 cells. Regarding cell invasion, CAPE treatment limited migration parameters in treated cells as compared to controls; in contrast, minimal effects were observed for the other two compounds: Kaempferol and Morin.

Finally, CAPE and Kaempferol were used to analyze gene expression (encoding and non-coding) in treated cells as compared to controls.

CAPE and Kaempferol have an inhibitory effect on the colon cancer cell lines RKO and HCT-116, both CAPE and Kaempferol inhibit proliferation, motility and cell invasion and stimulate apoptosis and autophagy and could be used in the future to develop new alternatives therapeutic strategies or to supplement the conventional treatment for this type of malignancy. Moreover, these compounds could also be used as preventive agents for delaying or inhibiting the cancer appearance.

Study 2 - Identification of natural phytochemical compounds effect on gene expression and validation of therapeutic effect at transcriptomic level in colon cancer

This study focuses on the transcriptoma analysis of molecular changes occurring after colon cancer cell lines HCT-116 and RKO treatment with the two natural compounds selected: CAPE and Kaempferol. These mRNA changes in the coding and non-coding gene profile highlight the specificity and complexity of polyphenols action mode in cancer inhibition, as well as the possibility of using them in personalized therapies.

Following the microarray studies on CAPE and Kaempferol, it results that the two phytochemicals have an inhibitory effect on the RKO and HCT-116 colon cancer cell lines, both CAPE and Kaempferol modulate the expression of overexpressed and subexpressed genes, which act as a tumor suppressor by inducing apoptosis and could be used in the future to develop new alternative therapeutic strategies or to complement conventional treatment for colon cancer. Moreover, these compounds could also be used as preventive agents for delaying or inhibiting cancer. These changes, resulting from the treatment of colon cancer cells and their specificity, demonstrate a complex action mechanism associated with natural compounds that could be exploited in personalized therapies. However, the heterogeneity of the transcriptomic profile highlights the need for long-term studies to determine the adverse effects that could occur following the modification of such a complex gene pattern.

Study 3 - Analysis of the phytochemical compounds mutagenic effect with implications in colon cancer through new generation sequencing

Study 3 aims to investigate the CAPE and Kaempferol ability to alter the mutant profile of colon cancer cell lines - HCT-116 and RKO - at the DNA level following *in vitro* treatment for 48 hours by sequencing new generation.

To investigate activity of natural phytochemical compounds, the RKO and HCT-116 cell lines were sequenced at the DNA level after 48 hours exposure to CAPE and Kaempferol compared to untreated control cells.

It has been noticed that the lines treated with CAPE and Kaempferol no longer have pathogenic mutations.

Our findings indicate that CAPE and Kaempferol have the ability to negatively influence *in vitro* colon cancer development and progress by specific molecular modification of cells; this activity may be exploited in possible adjuvant therapies using the optimal dose concentration with minimal side effects but with cancer inhibitory activity *in vivo*.

Study 4 - Functional evaluation of the different gene package expressed between the CAPE and Kaempferol group and the control group on colon cancer cell lines RKO and HCT 116 - the role of miRNA/siRNA in biological processes regulation

This study is based on the role of miARN / siRN elucidation in the translational processes regulation.

When changes occur in a transcriptional network, it is not only important to know which are the most modified genes in terms of gene expression level but also what are the most relevant changes in the network context. It is important to identify the interconnections between the altered genes between two biological conditions, the identification of central miRNAs in these networks can be seen as a potential prognostic or therapeutic biomarker, considering that modifying a miRNA may have a great impact on the therapeutic targets , than by targeting a single gene. The therapeutic effectiveness of a single dose of siRNA or miARN depends on a number of factors. These include the stability of RNA molecules, the degree of release from the surface or the inside of the therapeutic nanosite, as well as the half-life and the turnover rate. A better understanding of the action mechanism can contribute to the development of new therapeutic strategies using siRNA or miRNA.

Following colon cancer lines RKO and HCT 116 treatment with natural phytochemicals, CAPE and Kaempferol followed by microarray analysis, the occurrence of altered biological processes was observed.

Our data provides an expression pattern, functionally coordinated by different gene families interconnected with miRNAs that may have new therapeutic targets for treating cancer. Here we have to balance the high specificity of siRNA for a particular

gene, or the ability to simultaneously target multiple genes, which may in some cases be nonspecific.

General conclusions and study novelty

Following *in vitro* functional studies on CAPE and Kaempferol, it was found that the two phytochemicals have an inhibitory effect on the colon cancer cell lines RKO and HCT-116 and could be used in the future to develop new alternative therapeutic strategies or to complement the effectiveness of conventional treatment strategies for this malignancy. Furthermore, these compounds could also be used as preventive agents for delaying or inhibiting the cancer occurrence. In any case, important aspects of *in vivo* effects such as dose efficiency, effects on healthy cells, molecular changes, bioavailability and long-term exposure need to be addressed before coherent criteria for therapeutic strategies are formulated.

This PhD study contains novelty elements in individual studies and in overall research on the therapeutic effect of natural phytochemical compounds in colon cancer.

Specifically, *in vitro* research has demonstrated the ability of natural phytochemical compounds, CAPE and Kaempferol, to modulate extended encoding gene and long non-coding genes, but in a differentiated manner depending on the colon cancer cell line and the applied treatment.

Their effectiveness has also been demonstrated to eliminate pathogenic DNA mutations with inhibitory effect on colon cancer cell proliferation. This aspect is an important element in the therapeutic strategies formulation taking into consideration the ability of malignant cells to develop mutations to gain treatment resistance.

Overall, doctoral research brings new experimental data regarding the activity of natural phytochemical compounds in colon cancer, which contributes to the development of the preventive and therapeutic sector in the case of alternative medicine.

SELECTIVE REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Hainaut P, Plymoth A. Targeting the hallmarks of cancer: towards a rational approach to next-generation cancer therapy. *Current opinion in oncology*. 2013;25(1):50-1.
3. Cojocneanu Petric R, Braicu C, Raduly L, Zanoaga O, Dragos N, Monroig P, et al. Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone-related cancers. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:2053-66.
4. R. Karimi1 * KP, N. Hayati Roudbari1, S. Vakili Sadeghi1, M. Hashemi2, P. Hayat3. Anti-proliferative and Apoptotic Effects of morin in human Leukemia cell lines (HUT-78). *International Journal of Cellular & Molecular Biotechnology*. 2013;2013(2013):13.
5. Hsiang CY, Wu SL, Ho TY. Morin inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hepatocellular transformation via activator protein 1 signaling pathway and cell cycle progression. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(11):1603-11.
6. Kuo HM, Chang LS, Lin YL, Lu HF, Yang JS, Lee JH, et al. Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. *Anticancer research*. 2007;27(1A):395-405.
7. Kawabata K, Tanaka T, Honjo S, Kakumoto M, Hara A, Makita H, et al. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1999;83(3):381-6.
8. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer discovery*. 2011;1(5):391-407.
9. Liu G, Zheng X, Xu Y, Lu J, Chen J, Huang X. Long non-coding RNAs expression profile in HepG2 cells reveals the potential role of long non-coding RNAs in the cholesterol metabolism. *Chinese medical journal*. 2015;128(1):91-7.