

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Perspective și modele evoluționiste ale cancerului la sân

---

Doctorand **Iulia-Monica Hoge** (Groza)

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Patriciu Achimaș-Cadariu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	<b>17</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	<b>19</b>
<b>1. Cancerul la sân</b>	<b>21</b>
1.1. Epidemiologie, factori de risc în cancerul la sân	21
1.2. Stadializare	22
1.3. Incidența	24
1.4. Principii de tratament ale cancerului la sân	25
1.5. Medicina personalizată- testele genetice și genomice	26
1.6. Perspective în tratamentul cancerului la sân	26
<b>2. Principii ale teoriei evoluționiste în cancerul la sân</b>	<b>29</b>
2.1. Introducere	29
2.2. Determinisme ale evoluției cancerului	30
2.2.1. Heterogenitatea tumorală	30
2.2.2. Cauzele ale heterogenității tumorale	30
<b>3. Calea Hippo de semnalizare conservată în cursul evoluției</b>	<b>33</b>
3. 1. Fiziologic și patologic în cascada de semnalizare Hippo	33
3.2. Rolul căii Hippo în dezvoltarea glandei mamare și implicarea sa în cancerul la sân	34
3.3. Calea de semnalizare Hippo și implicarea sa în evitarea controlului sistemului imunitar	35
3.4. Calea de semnalizare Hippo și celulele stem	36
3.5. Calea de semnalizare Hippo și biogeneza miARN	36
3.6. Calea de semnalizare Hippo și terapia sistemică în cancerul la sân	37
<b>4. Comunicare intracelulară și intercelulară</b>	<b>39</b>
4.1. Definiție	39
4.2. Exozomii- definiție și context	39
4.3. Exozomii și cancerul la sân	41
4.4. Implicarea exozomilor în angiogeneză, hipoxie	42
4.5. Implicarea exozomilor în invazie, pregătirea nișei metastatice, și metastazare	43
4.6. Exozomii ca promotori ai rezistenței multidrog	44
4.7. Utilizarea exozomilor in practica clinică	46
4.7.1. Exozomii ca nanopurtători terapeutici în cancerul mamar	46
4.7.2. Exozomii ca metodă minim invazivă pentru diagnosticul	47

cancerului la sân	
4.8. Perspectivele de viitor	48
4.9. Instrumente online	48
4.10. Translația clinică	48
<b>5. Dinamica evolutivă a interacțiunii dintre celule stem tumorale și tranziția de la fenotipul epitelial la fenotipul mezenchimal</b>	51
5.1. Tumorigenicitatea celulelor stem	51
5.2. Tranziția de la fenotipul epitelial la cel mezenchimal, rolul acestui mecanism în progresia tumorală	53
5.3. Interacțiunea între tranziția de la fenotipul epitelial la cel mezenchimal și celulele stem tumorale	54
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	57
<b>1. Obiectivele cercetării</b>	59
<b>2. Metodologie generală</b>	61
<b>3. Studiul 1. Implicarea TP73 și STK3 în cancerul la sân</b>	63
3.1. Introducere	63
3.2. Ipoteza de lucru	64
3.3. Material și metodă	64
3.3.1. Analiza setului de date TCGA a principalelor gene Hippo în cancerul de sân	64
3.3.2. Rețeaua Hippo	65
3.3.3. Rețeaua miARN-mARN a genelor hub selectate	65
3.3.4. Validarea valorii predictive ca biomarker pentru TP53, TP73 și STK3 în cancerul la sân	65
3.4. Rezultate	65
3.4.1. Analiza expresiei genelor utilizând analiza portalului de date TCGA, aplicând baza de date STARBASE pentru genele cheie de semnalizare Hippo	65
3.4.2. Valoarea prognostică a principalelor gene Hippo în cancerul la sân	69
3.4.3. Rețeaua de interacțiune miARN-mARN.	72
3.4.4. Validarea ca biomarkeri predictivi pentru TP53, TP73 și STK3 în cancerul la sân	75
3.5. Discuții	76
3.6. Concluzii	77
<b>4. Studiul 2. Validarea nivelelor de expresie genică implicate în componenta de bază a căii de semnalizare Hippo</b>	79
4.1. Introducere	79
4.2. Ipoteza de lucru	79
4.3. Material și metodă	79

4.4. Rezultate	82
4.5. Discuții	83
4.6. Concluzii	83
<b>5. Studiul 3. Caracteristicile (de celulă) stem asociate cancerului și semnăturile specifice tranziției de la fenotip epitelial la fenotip mezenchimal în prognosticul carcinomului la sân invaziv</b>	<b>85</b>
5.1. Introducere	85
5.2. Ipoteza de lucru	85
5.3. Material și metodă	87
5.3.1. Evaluarea nivelului de expresie pentru gene și miRNA în cancerul la sân	87
5.3.2. Analiza rețelei de interconexiune în cancerul la sân	87
5.3.3. Analiza de supraviețuire	87
5.3.4. Validarea genelor și a miARN-urilor folosind probe de cancer la sân în stadii incipiente	87
5.4. Rezultate	89
5.4.1. Analiza celulelor tumorale mamare dezvăluie profiluri distincte de expresie pentru tranziția de la fenotip epitelial la fenotip mezenchimal	89
5.4.2. Integrarea datelor legate de nivelul de expresie a genelor alterate în CS în mecanismele moleculare și celulare	92
5.4.3. Construirea unei rețele de gene implicate în CST și EMT pentru genele cancerului la sân	96
5.4.4. Construirea unei rețele de miARN implicate atât în CST, cât și în EMT	100
5.4.5. Validarea datelor de transcriptomică în CS prin prin reacția de polimerizare în lanț cantitativă în timp real (qRT-PCR)	106
5.5. Discuții	107
5.6. Concluzii	111
<b>6. Concluzii generale</b>	<b>113</b>
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	<b>119</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>123</b>

**Cuvinte cheie:** cancer la sân, calea Hippo, TP73, STK3, celule stem tumorale, tranziție mezenchimală

## Introducere

Cancerul la sân (CS) este una dintre cele mai frecvente boli oncologice, cu incidență și mortalitate care cresc de la an la an, fiind la ora actuală una dintre cele mai importante probleme de sănătate la nivel mondial. În ciuda celor mai recente descoperiri în cercetare și management clinic al CS, evoluția imprevizibilă a acestui tip de neoplazie constituie o reală provocare în practica oncologică curentă.

S-a pornit în această cercetare de la premisa că teoria evoluționistă poate fi folosită pentru a analiza dinamica populațiilor de celule tumorale și pentru a prevedea istoria evoluției unei tumori pornind de la date moleculare. După analiza literaturii privind recente abordări în evoluția CS, s-a ajuns la concluzia că modelul evoluționist ajută la înțelegerea apariției neoplaziilor și joacă un rol prognostic important în anticiparea progresiei tumorale și a răspunsului la tratament.

## Stadiul actual al cunoșterii

Lucrarea este structurată pornind de la date teoretice. Noile perspective și modelele evoluționiste recent dezvoltate în cazul patologiilor tumorale au adus în lumina cercetărilor calea Hippo, o cale de transducție a semnalelor, conservată evolutiv, cu rol major în reglarea multor procese de creștere, în controlul arhitecturii țesuturilor, a regenerării acestora, în modularea răspunsului imunitar, în dezvoltarea tumorilor și în multe alte procese fiziologice sau patologice. Există dovezi care susțin faptul că diferite modificări genetice din cadrul căii de semnalizare Hippo sunt puternic corelate cu cancerul la sân. Calea Hippo favorizează tumorigeneza și evoluția CS, prin creșterea potențialului metastatic și activarea mecanismelor de rezistență la medicamente.

Carcinogeneza are ca element principal comunicarea intercelulară și intracelulară, componente ale semnalizării celulare. Între cele două tipuri de comunicări există o strânsă interdependență, deoarece orice acțiune între celule poate implica micromediul și viceversa. Printre veziculele cu importanță în comunicarea intracelulară și intercelulară se amintesc exozomii. Aceștia mediază comunicarea într-o populație de celule tumorale heterogene. Încărcătura lor este compusă din oncogene și oncomiR (microARN asociat cancerului) care modifică scenariul transcriptomic al celulelor țintă și activează numeroase căi de semnalizare care promovează tumorigeneza. Exozomii secretați de celulele implicate în CS duc la o proliferare celulară accentuată, la imortalitate replicativă, angiogeneză, invazie, migrație și chimiorezistență.

Tumorile solide și în particular cancerul la sân, cuprind o anumită categorie aparte de celule tumorale, denumite celule stem tumorale (CST). Acestea au un potențial de proliferare infinit, sunt multipotente, posedă capacitate de auto-reînnoire, intervin în recidiva tumorală și în metastazare, prezentând în ansamblu rezistență la

tratamentele antitumorale. Tranziția epitelial-mezenchimală (EMT) este un proces în timpul căruia celulele epiteliale dobândesc fenotipul celulelor stem mezenchimale. Asocierea dintre CST și EMT este de interes datorită rolului similar pe care aceste două procese îl joacă în metastazarea celulelor tumorale. EMT, pe lângă faptul că intervine în metastazarea tumorilor umane, este strâns legată de funcția CST. Mai recent, au apărut dovezi că celulele au dobândit proprietăți asemănătoare cu cele ale CST sub influența procesului EMT, ceea ce duce la creșterea frecvenței recidivelor, a rezistenței la medicamente și a frecvenței metastazelor.

## Contribuția personală

Cercetarea practică s-a concretizat în trei studii. Pentru primele două studii, am pornit de la ipoteza că, în timpul progresiei tumorale, componentele de bază ale căii Hippo, care este interconectată cu genele TP53 și TP73, au un rol important în reglarea proceselor de carcinogeneză. Studiul 1 a fost conceput folosind datele TCGA (The Cancer Genomic Atlas) și a fost validat în continuare în cohorta pacienților noștri în Studiul 2. În cel de al treilea studiu, am investigat mecanismul de tranziție epitelial-mezenchimală (EMT) și celulele stem tumorale (CST), demonstrând prezența unei interconexiuni între acestea.

### Studiul 1. Implicarea TP73 și STK3 în cancerul la sân

**Obiective.** Studiul 1 a fost conceput folosind datele din Atlasul Genomic al Cancerului (TCGA) pentru cancerul la sân, prin intermediul interfeței online a programului STARBASE, pentru a evalua nivelul de expresie a genelor codificatoare și necodificatoare.

**Material și metodă.** Prin intermediul interfeței online a programului STARBASE, am evaluat nivelul de expresie a genelor codificatoare și necodificatoare, analiza fiind realizată pe un set de date provenind de la un lot de 1104 probe de cancer la sân și 113 țesuturi adiacente normale din baza de date TCGA. Folosind programul miRNET și analize corelate ale setului de date TCGA (utilizând interfața STARBASE), a fost generată o rețea de tip mRNA-miRNA, în vederea stabilirii nivelului de interconectivitate între genele codificatoare și necodificatoare selectate pentru analiză implicate în calea Hippo.

**Rezultate.** Între genele selectate, doar două (STK3 și TP73) au fost corelate cu rata de supraviețuire. După integrarea într-o rețea miARN-mARN, doar miR-34a a putut fi corelat cu rata globală de supraviețuire. O valoare scăzută a miR-34a în probele de țesut de parafină a fost corelată cu rata de supraviețuire a pacienților cu cancer la sân, un nivel de expresie scăzut fiind corelat cu un prognostic nefavorabil. S-a arătat că

pacientele cu un nivel de expresie scăzut a miR-34a au avut o supraviețuire generală și o supraviețuire fără progresia bolii mai slabe în comparație cu cele cu expresie ridicată.

**Concluzii.** În ciuda progreselor recente, puzzle-ul nerezolvat al complexității, redundanței și ierarhiei membrilor familiei p53 (TP53 și TP73) continuă să reprezinte o provocare formidabilă, care este, de asemenea, susținută de datele obținute în studiul de față. Am constatat că STK3 și TP73 împreună cu miR-34a-5p din rețeaua de interacțiune au un rol prognostic. Analiza expresiei acestora, precum și căutarea de corelații și legături cu datele clinice și biologice ale tumorilor au arătat că expresia acestor gene, precum și reglarea post-transcripțională a expresiei lor de către miARN-uri, sunt factori predictivi ai evoluției tumorale și ai răspunsului la tratament.

## **Studiu 2. Validarea nivelelor de expresie pentru genele implicate în componenta de bază a căii de semnalizare Hippo.**

**Obiective.** În acest studiu, în continuarea studiului precedent, focusul a fost pus pe înțelegerea funcțiilor componentelor de bază ale căii Hippo și am realizat validarea datelor prin qRT-PCR pentru cancer la sân în diferite stadii, în încercarea de a dovedi faptul că această cale de semnalizare este activată chiar și din stadiile timpurii ale carcinogenezei.

**Material și metodă.** Am efectuat analiza profilului expresiei genelor pe probe de cancer la sân, încercând validarea qRT-PCR a LATS2, TAZ, STK3, YAP1, TP73; gena B2M a fost utilizată ca genă de referință, normalizarea datelor qRT-PCR a fost realizată folosind metoda  $\Delta\Delta Ct$ . Validarea datelor de expresie genică a fost efectuată folosind 30 de probe de țesut tumoral și 30 de țesuturi mamare normale adiacente.

**Rezultate.** Analiza nivelurilor de expresie a genelor a arătat că STK3 și TAZ au fost supraexprimate, în timp ce LATS2, YAP și TP73 au fost subexprimate în țesuturile tumorale față de țesuturile mamare normale adiacente.

**Concluzii.** În mai multe tumori solide, inclusiv în cancerul la sân, s-a observat un nivel de expresie genică modificat și TP73 suplimentar a fost corelat cu unii parametri clinici relevanți. În cazul cancerului la sân, a fost confirmată o corelație semnificativă între supraexpresia TP73 și tumorile cu metastaze la nivelul ganglionilor limfatici, invazie vasculară și un stadiu patologic mai avansat

## **Studiu 3. Caracteristicile (de celulă) stem tumorală și semnăturile specifice tranziției de la fenotip epitelial la fenotip mezenchimal în prognosticul carcinomului mamar invaziv**

**Obiective.** S-a investigat mecanismul de tranziție epitelial-mezenchimală și celulele stem tumorale, încercând descoperirea prezenței unei interconexiuni între acestea.

**Material și metodă.** Folosind datele de genomică pentru cancerul la sân (pe baza datelor publice disponibile din Atlasul Omics al Cancerului-TCOA care reprezintă o bază de date dezvoltată pe baza datelor din TCGA), am încercat identificarea căilor potențiale pe care celulele tumorale le pot coopta pentru a depăși inhibarea proliferării celulare, în special mecanisme implicate în tranziția de la fenotip mezenchimal la fenotip epitelial (EMT) și relația cu celule stem tumorale (CST), urmărindu-se identificarea unei semnături comune de gene și miARN-uri cu valoare de biomarker diagnostic/prognostic, dar și de ținte terapeutice.

**Rezultate.** Analiza celulelor tumorale mamare dezvăluie profiluri distincte de expresie pentru tranziția de la fenotip epitelial la fenotip mezenchimal. Analiza expresiei genice cu ajutorul TCOA a evidențiat prezența a 2368 de gene modificate, constând în 674 de gene supraexprimate și 1694 de gene subexprimate. Analiza miARN a identificat modele de expresie modificate pentru 47 de transcripții, constând în 19 miARN-uri supraexprimate și 28 de miARN-uri subexprimate. S-a obținut integrarea datelor legate de nivelul de expresie a genelor alterate în CS în mecanismele moleculare și celulare. S-a construit o rețea de gene implicate în CST și EMT pentru genele cancerului la sân și o rețea de miARN implicate atât în CST, cât și în EMT. Pentru a valida modificările observate ale expresiei genelor și miARN-urilor, qRT-PCR a fost efectuată pentru genele KIT și LIF, în care genele B2M și GAPDH au fost folosite ca și controale endogene pentru normalizarea datelor qRT-PCR. Validarea acestor gene și a miARN-urilor au fost realizate pe un lot de 30 de probe de țesut colectate din stadiile incipiente ale cancerului de sân, precum și a 30 de probe de țesuturi normale la distanță. O analiză a nivelului de expresie agenelor a arătat că nivelurile KIT au fost semnificativ mai mici, în timp ce cele ale LIF au fost supraexprimate în țesuturile tumorale, comparativ cu cele ale țesuturilor normale. Pentru analiza miARN, atât nivelurile miR-125b cât și miR-224-5p au fost mai mici, în timp ce cele pentru miR-21-5p și miR-200c-3p au fost mai mari în țesuturile tumorale față de țesuturile normale. Aceste rezultate qRT-PCR validează în continuare profilurile anterioare de expresie genică și miARN-urilor observate din analizele bionformatică pe datele de TCGA pentru CS.

**Concluzii.** Am încercat demonstrarea faptului că există o caracteristică comună între CST și EMT, iar aceasta este reprezentată de ALDH1A1, SFRP1, miR-139, miR-21 și miR-200c.

## **Concluzii generale, originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

Contribuțiile potențiale propuse prin acest studiu de cercetare se referă la îmbunătățirea și aprofundarea înțelegerii evoluției tumorilor la sân. În studiul efectuat am constatat că STK3 și TP73 împreună cu miR-34a-5p din rețeaua de interacțiune au



un rol prognostic. Analiza expresiei acestora, precum și căutarea de corelații și legături cu datele clinice și biologice ale tumorilor au arătat că expresia acestor gene, precum și reglarea post-transcripțională a expresiei lor de către miARN-uri, sunt factori predictivi ai evoluției tumorale și ai răspunsului la tratament.

Deoarece qRT-PCR poate fi aplicată direct pe țesutul tumoral proaspăt și blocuri de parafină, markerii validați a căror semnificație prognostică este determinată de amplificarea genică pot fi transferați cu ușurință în practica clinică. Investigarea în continuare a acestor gene poate permite rafinarea semnăturilor și subtipurilor moleculare ale cancerului de sân și dezvoltarea unor teste de prognostic mai bune și predicția răspunsului la terapie.

Alterări ale genelor codificatoare și necodificatoare sunt legate de tumorigeneză și de recidivele cancerului la sân. Am identificat mai multe gene-cheie asociate cu tranziția epitelial-mezenchimală (EMT) și cu caracteristicile celulelor stem canceroase (CST). EMT și CST-urile sunt două mecanisme cheie responsabile de auto-reînnoire, diferențiere și autoprotecție, contribuind astfel la rezistența la medicamente. Prin urmare, înțelegerea relației dintre aceste procese poate identifica o vulnerabilitate terapeutică care poate fi exploatată în continuare în practica clinică și poate evalua corelația sa cu rata de supraviețuire globală. Pentru a determina nivelurile de expresie ale genelor codificatoare și necodificatoare cu un nivel de expresie alterat, am utilizat Atlasul Omics al Cancerului (TCOA), iar aceste date sunt suprapuse cu o listă de gene specifice CST și EMT descărcate de pe NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ca urmare, am observat că CST-urile sunt reciproc legate de EMT, identificând astfel semnături comune care permit predicția supraviețuirii globale pentru genele cancerului la sân. De fapt, semnăturile comune CST și EMT, reprezentate de ALDH1A1, SFRP1, miR-139, miR-21 și miR-200c, sunt considerate utile ca biomarkeri de prognostic pentru cancerul la sân. Prin urmare, prin cartografierea modificărilor în expresia genelor în CST și EMT, sugerând o legătură încrucișată între aceste două procese, am reușit să identificăm fie cele mai comune, fie genele specifice sau markerii miARN asociați cu rata de supraviețuire globală. Astfel, o mai bună înțelegere a acestor mecanisme va conduce la opțiuni de tratament mai eficiente.

Per ansamblu, acest studiu susține utilitatea bazelor de date publice pentru a investiga mecanismele moleculare implicate în cancerul la sân. În particular, acest studiu a explorat nivelul de expresie la nivel de ARNm și valorile prognostice ale genelor-cheie implicate în semnalizarea Hippo din cancerul la sân, a oferit cunoștințe detaliate despre mecanismele moleculare asociate cu EMT și CST și a identificat markeri utili pentru predicțiile privind rezultatele supraviețuirii. Aceste cunoștințe pot fi utile pentru identificarea unor noi medicamente împotriva cancerului și pentru continuarea studiilor de cercetare asociate.

---

PhD THESIS SUMMARY

# Evolutionary Perspectives and Models in Breast Cancer

---

PhD student **Iulia-Monica Hoge** (Groza)

---

PhD supervisor Prof.dr. **Patriciu Achimaş-Cadariu**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# SUMMARY

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Breast cancer</b>	21
1.1. Epidemiology, risk factors in breast cancer	21
1.2. Staging	22
1.3. Incidence	24
1.4. Principles of breast cancer treatment	25
1.5. Personalised medicine - genetic and genomic testing	26
1.6. Insights into breast cancer treatment	26
<b>2. Principles of evolutionary theory in breast cancer</b>	29
2.1. Introduction	29
2.2. Determinants of cancer development	30
2.2.1. Tumor heterogeneity	30
2.2.2. Causes of tumor heterogeneity	30
<b>3. Hippo signalling pathway conserved during evolution</b>	33
3. 1. Physiological and pathological in the Hippo signalling cascade	33
3.2. Role of the Hippo pathway in mammary gland development and its involvement in breast cancer	32
3.3. The Hippo signalling pathway and its involvement in immune checkpoint evasion	34
3.4. Hippo signalling pathway and stem cells	35
3.5. Hippo signalling pathway and miRNA biogenesis	36
3.6. Hippo signalling pathway and systemic therapy in breast cancer	37
<b>4. Intracellular and intercellular communication</b>	39
4.1. Definition	39
4.2. Exosomes- definition and context	39
4.3. Exosomes and breast cancer	41
4.4. Exosomes involvement in angiogenesis, hypoxia	42
4.5. Involvement of exosomes in invasion, metastatic niche preparation, and metastasis	43
4.6. Exosomes as promoters of multidrug resistance	44
4.7. The use of exosomes in clinical practice	46

4.7.1. Exosomes as therapeutic nanocarriers in breast cancer	46
4.7.2. Exosomes as a minimally invasive method for breast cancer diagnosis	47
4.8. Future perspectives	48
4.9. Online tools	48
4.10. Clinical translation	48
<b>5. Evolutionary dynamics of tumor stem cell interaction and the transition from epithelial to mesenchymal phenotype</b>	51
5.1. Stem cell tumorigenicity	51
5.2. Transition from epithelial to mesenchymal phenotype, role of this mechanism in tumor progression	53
5.3. Interaction between epithelial to mesenchymal phenotype transition and cancer stem cells	54
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	57
<b>1. Aims</b>	59
<b>2. General methodology</b>	61
<b>3. Study 1. TP73 and STK3 implication in breast cancer</b>	63
3.1. Introduction	63
3.2. Aims	64
3.3. Material and Methods	64
3.3.1. TCGA dataset-mining analysis of key Hippo genes in breast cancer	64
3.3.2. Hippo Network	65
3.3.3. miRNA-mRNA network of selected hub genes	65
3.3.4. Validation of the predictive value as a biomarker for TP53, TP73 and STK3 in breast cancer	65
3.4. Results	65
3.4.1. Gene expression analysis using the TCGA data portal analysis, applying the STARBASE database for key Hippo signalling genes	65
3.4.2. Prognostic value of key Hippo genes in breast cancer	69
3.4.3. miRNA-mRNA interaction network	72
3.4.4. Validation as predictive biomarkers for TP53, TP73 and STK3 in breast cancer	75
3.5. Discussions	76
3.6. Conclusions	77
<b>4. Study 2. Validation of the key altered Hippo genes in breast cancer</b>	79

4.1. Introduction	79
4.2. Aims	79
4.3. Material and Methods	79
4.4. Results	82
4.5. Discussions	83
4.6. Conclusions	83
<b>5. Study 3. Cancer-associated stemness and epithelial to mesenchymal transition signatures related to breast cancer prognostic</b>	<b>85</b>
5.1. Introduction	85
5.2. Aims	85
5.3. Material and Methods	87
5.3.1. Differential gene and miRNA expression analysis for breast cancer	87
5.3.2. Network analysis	87
5.3.3. Survival analysis	87
5.3.4. Gene and miRNA validation using early stage breast cancer tissue samples	87
5.4. Results	89
5.4.1. Breast cancer cell analysis reveals distinct expression profiles for EMT	89
5.4.2. Integrating altered genes to tumorigenesis and molecular pathways	92
5.4.3. Construction of a gene network involved in CSCs and EMT for breast cancer genes	96
5.4.4. Construction of a miRNA network involved in both CSCs and EMT	100
5.4.5. Validation of altered transcriptomic patterns by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	106
5.5. Discussions	107
5.6. Conclusions	111
<b>6. General conclusions</b>	<b>113</b>
<b>7. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>123</b>

**Keywords:** breast cancer, exosomes, Hippo pathway, TP73, STK3, mesenchymal transition, cancer stem cells

## **Introduction**

Breast cancer (BC) is one of the most common oncological diseases, with incidence and mortality increasing every year and is currently one of the most important health problems worldwide. Despite the latest advances in research and clinical management of breast cancer, the unpredictable evolution of this type of neoplasia is a real challenge in current oncological practice.

In this research, we started from the premise that evolutionary theory can be used to analyse the dynamics of tumor cell populations and to predict the evolutionary history of a tumor from molecular data. After reviewing the literature on recent approaches in BC evolution, we concluded that the evolutionary model helps to understand the occurrence of neoplasia and plays an important prognostic role in predicting tumor progression and response to treatment.

## **Current state of knowledge**

The paper is structured from theoretical data. New insights and recently developed evolutionary models in tumor pathologies have brought to light the Hippo pathway, an evolutionarily conserved signal transduction pathway with a major role in regulating many growth processes, controlling tissue architecture, tissue regeneration, modulating immune response, tumor development and many other physiological or pathological processes. There is evidence that various genetic alterations in the Hippo signalling pathway are strongly correlated with breast cancer. The Hippo pathway promotes tumorigenesis and breast cancer progression by increasing metastatic potential and activating drug resistance mechanisms.

Carcinogenesis is driven by intercellular and intracellular communication, components of cell signalling. There is a close interdependence between the two types of communication, as any action between cells can involve the microenvironment and vice versa. Among the vesicles of importance in intracellular and intercellular communication are exosomes. They mediate communication in a heterogeneous tumor cell population. Their cargo is composed of oncogenes and oncomiR (cancer-associated microRNAs) that alter the transcriptomic scenario of target cells and activate numerous signalling pathways that promote tumorigenesis. Exosomes secreted by cells involved in BC lead to enhanced cell proliferation, replicative immortality, angiogenesis, invasion, migration and chemoresistance.

Solid tumors, and in particular breast cancer, comprise a particular category of tumor cells, called cancer stem cells (CSCs), which have infinite proliferation potential, are multipotent, possess self-renewal capacity, are involved in tumor recurrence and

metastasis, and are resistant to anti-tumor treatments. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a process during which epithelial cells acquire the phenotype of mesenchymal stem cells. The association between cancer stem cells and EMT is of interest because of the similar role these two processes play in tumor cell metastasis. EMT, in addition to being involved in the metastasis of human tumors, is closely related to CSCs function. More recently, evidence has emerged that cells have acquired CSCs-like properties under the influence of the EMT process, leading to increased relapse frequency, drug resistance and metastasis frequency.

## Personal contribution

The practical research has resulted in three studies. For the first two studies, I started from the hypothesis that, dysregulation of the Hippo pathway is frequently linked to the development and progression of many cancers, including breast carcinoma. During tumor progression, the core components of the Hippo pathway collaborate with TP53 and TP73 to suppress carcinogenesis. The study was designed using TCGA (The Cancer Genomic Atlas) data, and further validated in our patients' cohort in Study 2. In the third study, we investigated the mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells (CSCs), demonstrating the presence of an interconnection between these.

### Study 1. Involvement of TP73 and STK3 in breast cancer

**Objectives.** Study 1 was designed using data from the Cancer Genomic Atlas (TCGA) for breast cancer via the STARBASE online interface to assess the expression levels of coding and non-coding genes.

**Material and method.** Using the STARBASE online interface, we assessed the expression level of coding and noncoding genes, with analysis performed on a dataset from a batch of 1104 breast cancer samples and 113 adjacent normal tissues from the TCGA database. Using miRNET software and correlated TCGA dataset analyses (using STARBASE interface), an mRNA-miRNA network was generated to determine the level of interconnectivity between coding and non-coding genes selected for analysis involved in the Hippo pathway.

**Results.** Among the selected genes, only two (STK3 and TP73) correlated with survival rate. More were integrated into a miRNA-mRNA network, only miR-34a could be correlated with overall survival rate. Down-regulation of miR-34a in paraffin-embedded tissue samples was correlated with the survival rate of breast cancer patients, a low expression level for this being correlated with a poor prognosis. It was shown that patients with a low expression level of miR-34a had poorer overall survival and progression-free survival compared to those with high expression.

**Conclusions.** Despite recent progress, the unsolved puzzle of complexity, redundancy and hierarchy of p53 family members (TP53 and TP73) continues to pose a formidable challenge, which is also supported by the data obtained in the present study. We found that STK3 and TP73 together with miR-34a-5p in the interacting network play a prognostic role. Analysis of their expression as well as the search for correlations and links with clinical and biological tumor data showed that the expression of these genes, as well as post-transcriptional regulation of their expression by miRNAs, are predictive factors of tumor progression and treatment response.

## **Study 2. Validation of the key altered Hippo genes in breast cancer**

**Objectives.** In this study, following on from the previous study, the focus was on understanding the functions of the basic components of the Hippo pathway. For this reason, we performed qRT-PCR data validation for breast cancer at different stages in an attempt to prove that thus this signalling pathway is activated even from the early stages of carcinogenesis.

**Material and method.** We performed gene expression profile analysis on breast cancer samples, attempting qRT-PCR validation of LATS2, TAZ, STK3, YAP1, TP73; B2M gene was used as reference gene, normalization of qRT-PCR data was performed using  $\Delta\Delta C_t$  method. Validation of gene expression data was performed using 30 tumor tissue samples and 30 adjacent normal breast tissues.

**Results.** Validation of the key altered Hippo genes in breast cancer by qRT-PCR revealed STK3 and TAZ upregulation, while LATS2, YAP and TP73 were downregulated in tumor tissue versus adjacent normal breast tissues.

**Conclusions.** In several solid tumors, including breast cancer, altered gene expression levels were observed and additional TP73 was correlated with some relevant clinical parameters. In breast cancer, a significant correlation was confirmed between TP73 overexpression and tumors with lymph node metastasis, vascular invasion and more advanced pathological stage

## **Study 3. Cancer-associated stemness and epithelial to mesenchymal transition signatures related to breast cancer prognostic**

**Objectives.** The mechanism of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells was investigated, attempting to discover the presence of an interconnection between them.

**Material and method.** Using genomic data for breast cancer (based on publicly available data from TCOA, a database developed based on TCGA data), we sought to identify potential pathways that tumor cells may co-opt to overcome inhibition of cell proliferation, in particular the mechanisms involved in the transition from mesenchymal to epithelial phenotype (EMT) and the relationship with cancer stem



cells (CSCs), aiming to identify a common signature of genes and miRNAs with diagnostic/prognostic biomarker value as well as therapeutic targets.

**Results.** Analysis of breast tumor cells reveals distinct expression profiles for the transition from epithelial to mesenchymal phenotype. Gene expression analysis using TCOA revealed the presence of 2368 altered genes, consisting of 674 overexpressed genes and 1694 downregulated genes. Moreover, miRNA analysis identified altered expression patterns for 47 transcripts, consisting of 19 overexpressed and 28 downregulated miRNAs. Integrating altered genes to tumorigenesis and molecular pathways was obtained. A gene network involved in CSCs and EMT for breast cancer genes and a miRNA network involved in both CSCs and EMT were constructed. In order to further validate the observed gene and miRNA expression changes, qRT-PCR was conducted for KIT and LIF genes, wherein B2M and GAPDH genes were used as endogenous controls for normalization of the qRT-PCR data. Validation of these genes and miRNA transcripts were conducted using 30 tissue samples collected from the early stages of breast cancer, as well as of matched pairs of 30 samples of distant normal tissues. An analysis of gene expression levels showed that KIT levels were significantly lower, while LIF levels were overexpressed in tumor tissues compared to normal tissues. For miRNA analysis, both miR-125b and miR-224-5p levels were lower, while those for miR-21-5p and miR-200c-3p were higher in tumor tissues compared to normal tissues. These qRT-PCR results further validate previous gene expression and miRNA profiles observed from bioinformatic analyses on TCGA data for BC.

**Conclusions.** We attempted to demonstrate that there is a common feature between CSCs and EMT, and this is represented by ALDH1A1, SFRP1, miR-139, miR-21 and miR-200c. Thus, by combining molecular methods with bioinformatics technologies, it was intended to identify personalised therapeutic options and select a personalised treatment, thus aiming to increase therapeutic efficacy by stratifying patients based on molecular profiling data in breast cancer.

## Overall conclusions, originality and innovative contributions of the thesis

The potential contributions proposed by this research study relate to improving and deepening our understanding of breast tumor progression. In this study we found that STK3 and TP73 together with miR-34a-5p in the interaction network have a prognostic role. Analysis of their expression, as well as the search for correlations and links with clinical and biological tumor data showed that the expression of these genes,

as well as post-transcriptional regulation of their expression by miRNAs, are predictive factors of tumor progression and response to treatment.

Because qRT-PCR can be applied directly to fresh tumor tissue and paraffin blocks, validated markers whose prognostic significance is determined by gene amplification can be easily transferred to clinical practice. Further investigation of these genes may allow refinement of the molecular signatures and subtypes of breast cancer and development of better prognostic tests and prediction of response to therapy.

Alterations in coding and non-coding genes are linked to tumorigenesis and breast cancer recurrence. We have identified several key genes associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cell (CSCs) characteristics. EMT and CSCs are two key mechanisms responsible for self-renewal, differentiation and self-protection, thus contributing to drug resistance. Therefore, understanding the relationship between these processes can identify a therapeutic vulnerability that can be further exploited in clinical practice and assess its correlation with overall survival rate. To determine the expression levels of coding and non-coding genes with altered expression levels, we have utilized the Omics Cancer Atlas (TCOA), and these data are overlapped with a list of specific CSCs and EMT genes downloaded from NCBI (National Center for Biotechnology Information). As a result, we observed that CSCs are reciprocally related to EMT, thus identifying common signatures that allow prediction of overall survival for breast cancer genes. In fact, the common CSCs and EMT signatures, represented by ALDH1A1, SFRP1, miR-139, miR-21 and miR-200c, are considered useful as prognostic biomarkers for breast cancer. Therefore, by mapping changes in gene expression in CSCs and EMT, suggesting a cross-link between these two processes, we were able to identify either the most common or specific genes or miRNA markers associated with overall survival rate. Thus, a better understanding of these mechanisms will lead to more effective treatment options.

Overall, this study supports the utility of public databases to investigate the molecular mechanisms involved in breast cancer. In particular, this study explored mRNA-level expression levels and prognostic values of key genes involved in Hippo signalling in breast cancer, provided detailed insights into the molecular mechanisms associated with EMT and CSCs, and identified markers useful for predicting survival outcomes. This knowledge may be useful for the identification of new anticancer drugs and associated further research studies.