
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

ARN-uri lungi non-codificatoare în cancerul oral

Doctorand **Ovidiu Aghiorghiesei**

Conducător științific Prof. Dr. **Radu Septimiu Câmpian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Cancerul oral	19
1.1. Diagnostic și tablou clinic	19
1.2. Patogeneza moleculară	20
1.3. Opțiuni terapeutice	22
2. Factori implicați în etiologia cancerului oral	25
2.1. Factori de risc	25
2.2. Factori de mediu	27
3. Profilul molecular al cancerului oral: microARN-uri	29
3.1. ARN-uri non-codificatoare	29
3.2. ARN-uri non-codificatoare lungi	29
3.3. MicroARN-uri	31
3.4. MicroARN-uri în cancerul oral	33
3.5. miR-21, miR-93, miR-200 family, miR-205 în cancerul oral	34
4. Modificări epigenetice în cancerul oral	37
4.1. Metilarea ADN în cancerul oral	38
4.2. Modificări histonice în cancerul oral	40
4.3. ARN-uri non-codificatoare și alterări epigenetice în cancerul oral	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	45
2. Metodologia generală	47
3. Studiul 1 – Analiza bioinformatică a ARN-urilor lungi non-codificatoare în cancerul oral	49
3.1. Introducere	49
3.2. Obiective	49
3.3. Material și metodă	49
3.4. RRezultate	51
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	57
4. Studiul 2 – Dereglările miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p and miR-205-5p în carcinomul oral cu celule scuamoase	59
4.1. Introducere	59
4.2. Obiective	60
4.3. Material și metodă	60
4.4. Rezultate	63
4.5. Discuții	67

4.6. Concluzii	68
5. Studiul 3 – Alterarea nivelurilor de expresie ale ARN-urilor lungi non-codificatoare H19 și MALAT1 în OSCC	69
5.1. Introducere	69
5.2. Obiective	69
5.3. Material și metodă	69
5.4. Rezultate	71
5.5. Discuții	76
5.6. Concluzii	77
6. Studiul 4 – Modificări epigenetice în cancerul oral	79
6.1. Introducere	79
6.2. Obiective	80
6.3. Material și metodă	80
6.4. Rezultate	83
6.5. Discuții	88
6.6. Concluzii	90
7. Concluzii generale	91
8. Originalitate și contribuții inovative ale tezei	93
9. ACKNOWLEDGEMENTS	94
BIBLIOGRAFIE	95

Cuvinte cheie: Cancer oral, COCS, ARN-uri non-codificatoare lungi, microARN-uri, profil molecular, markeri tumorali, mecanisme epigenetice, gene supresoare tumorale

INTRODUCERE

Diagnosticarea în stadii avansate este tipică pentru cancerul oral, dar tehnologiile moderne pot furniza informații referitoare la profilul molecular, prin intermediul studiilor de genomică și epigenetică. Acest progres tehnologic poate duce la îmbunătățirea diagnosticului și a prognosticului acestei boli devastatoare.

Carcinomul oral cu celule scuamoase (OSCC) este un proces complex cu multiple etape care duc la un dezechilibru al micromediului intracelular și la diverse modificări epigenetice, transcriptomice și genetice. Dovezile acumulate indică faptul că ARN-urile non-codificatoare (ncARN), cum ar fi microARN-urile (miARN), ARN-urile lungi non-codificatoare (lncARN) și alte tipuri de transcripți, joacă un rol critic în procesele celulare, iar mecanismele de reglare ale ncARN-urilor pot interacționa cu diverse specii de molecule prin diverse mecanisme moleculare. Această rețea de reglare este, de asemenea, aplicabilă pentru OSCC, așa cum a fost studiat în această teză.

Numeroase studii au arătat că nivelurile de expresie alterate ale mai multor ncARN sunt strâns corelate cu patogeneza cancerului și progresia bolii în OSCC. Cu toate acestea, nu s-a găsit un marker diagnostic perfect pentru OSCC. Unele lncARN-uri cu expresie aberantă au fost testate ca ținte terapeutice și au fost strâns corelate cu prognosticul cancerului.

Lucrarea de față a pornit de la date teoretice, sintetizate în partea de stadiu actual al cunoașterii, iar cancerul oral este o cauză principală de incidență și mortalitate la nivel mondial. Partea de contribuții personale este structurată în jurul a patru studii.

Primul studiu a implicat o analiză bioinformatică, care a furnizat o listă de candidați lncARN pentru o investigație ulterioară a rolului și mecanismelor lor în cancerul oral, cu un accent deosebit pe cei care controlează calea de semnalizare a ribonucleotidei reductazei.

Al doilea studiu a evaluat un panel de miARN-uri (miR-93-5p, miR-200c-3p, miR-21-5p și miR-205-5p). Al treilea studiu s-a concentrat pe evaluarea a două lncARN critice (H19 și Malat1), apoi a generat o rețea între acești transcripți non-codificatori și a validat cea mai relevantă genă-țintă - BCL2 - la nivelul ARNm și proteinelor K167, TP53 și BCL2. În plus, s-a dezvoltat o rețea între genele non-codificatoare și codificatoare evaluate în OSCC.

Ultimul studiu s-a concentrat pe metilarea anormală a promotorului unui panel de 22 de gene supresoare tumorale, punând accentul pe corelația cu rata generală de supraviețuire.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1 - Analiza bioinformatică a ARN-urilor lungi non-codificatoare în cancerul oral

Obiective

Scopurile studiului nostru au fost de a sublinia unele lncARN-uri cheie, rezumând dereglarea lor și mecanismele potențiale, vizând căile de semnalizare oncogenice și posibila lor aplicație clinică, folosind instrumente online precum miRNET sau Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Material și metodă

Descărcarea setului de date TCGA. Datele pentru cancerul oral au fost extrase din Carcinomul cu Celule Scuamoase al Capului și Gâtului, care include 519 mostre de tumori și 44 mostre de țesut normal adiacent tumorii. Datele brute au fost descărcate de la motoarele de căutare Genomice de la Universitatea California Santa Cruz (USCS).

Analiza bioinformatică a celor mai relevante lncARN-uri în cancerul oral. Analiza lncRNA-urilor modificate în cancerul oral a fost realizată folosind Gene Spring GX v.14.9 (Santa Clara, SUA). Analizele bioinformatică pentru expresie diferențială au fost efectuate în cazul țesutului tumoral (n = 321) versus țesutul normal (n = 30).

Analiza rețelelor IPA. Pentru a identifica molecule sau transcripte cheie asociate cu lncRNA selectate, s-a folosit Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood, CA, USA; www.ingenuity.com), luând în considerare toate informațiile disponibile în această bază de date, curată manual.

Interacțiunile miARN-lncARN folosind miRNET. Pentru a evalua interacțiunea dintre CASC9, LINP1, LASTR, HCP5, DANCR și HCG22 cu miARN s-a utilizat miRNET (<https://www.mirnet.ca>), un program online utilizat pe scară largă care permite vizualizarea rețelei și analiza funcțională.

Rezultate

În analiza bioinformatică a cohorței de pacienți TCGA, în țesuturile tumorale (n = 321) versus țesuturile normale (n = 30), am identificat 15 gene supraexprimate și 20 lncARN-uri subexprimate, considerând ca limită valorile de fold change (FC) de ± 2 și p-value ≤ 0.05 (corecție Benjamini-Hochberg).

Utilizând instrumentul de analiză de rețea în cadrul platformei software IPA, ne-am propus să precizem rețelele moleculare pentru a evalua potențiala aplicabilitate în managementul cancerului oral a acestor transcripti sau molecule direct implicate. Aceste analize sugerează că lncARN alterate în cancerul oral sunt interconectate cu gene-cheie integrate ca o rețea legată de dezvoltarea celulară, creșterea și proliferarea celulară, mișcarea celulară sau legate de expresia genelor, bolile infecțioase, dezvoltarea organismelor. O cale importantă de îmbogățire este legată de calea de semnalizare a ribonucleotidei reductazei.

Construcția rețelelor de reglementare lncARN-miARN, interacțiunile dintre lncARN și miARN, reprezintă un interes crescut pentru cercetare. Pentru a explora mai departe funcțiile principale ale lncARN dintr-o perspectivă globală, a fost generată o rețea lncARN-miARN prin intermediul miRNet, evidențiind rețele de reglementare complexe între ncARN-uri.

Concluzii

Acest studiu subliniază potențialul lncARN-urilor ca biomarkeri pentru diagnostic sau terapie. Datele noastre pot furniza o listă valoroasă de candidați lncARN pentru o examinare suplimentară a funcției și mecanismelor lor în cancerul oral.

Descifrarea mecanismelor prin care lncARN-urile afectează creșterea tumorii, în special cele implicate în calea semnalizării ribonucleotid-reductazei, este crucială pentru îmbunătățirea diagnosticului și tratamentului cancerului.

Țintirea acestor lncARN-uri cu abordări terapeutice noi ar putea duce la dezvoltarea unor tratamente mai eficiente pentru pacienții cu cancer, subliniind potențialul lncARN-urilor ca o țintă valoroasă pentru cercetarea cancerului.

Studiul rolului lncARN-urilor în cancer reprezintă o cale promițătoare pentru îmbunătățirea terapiei cancerului.

Studiul 2 - Dereglările miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p and miR-205-5p în carcinomul oral cu celule scuamoase

Obiective

Prin utilizarea PCR în timp real (qRT-PCR), acest studiu a avut ca scop determinarea nivelurilor de expresie a patru miARN-uri (miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p și miR-205-5p) în probe de țesut din OSCC și țesut normal adiacent, pentru a determina dacă aceștia ar putea forma un potențial panel de biomarkeri.

Material și metodă

În acest studiu a fost inclusă o cohortă de 33 de pacienți cu carcinom oral cu celule scuamoase. S-au utilizat tumori congelate proaspete și țesut normal adiacent acestora pentru cei 33 de pacienți. Utilizând standarde care au obținut acceptare internațională, diagnosticul a fost confirmat. Toți participanții la studiu au furnizat consimțământul lor informat. Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și aprobat de Comitetul de Etică Instituțională al Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hatieganu" din Cluj-Napoca, România, aprobarea nr. 147/06.05.2019.

Extragerea ARN-ului din țesuturile congelate proaspete a fost efectuată folosind metoda clasică fenol-cloroform după omogenizarea țesutului în 800 μ l TripleXtractor (Grisp, Porto, Portugalia).

Cantitatea de ARN obținută a fost măsurată folosind spectrofotometrul NanoDrop. Dintr-un volum de 1 μ l din acidul nucleic al probei, spectrofotometrul NanoDrop poate măsura spectrul între 220-750 nm.

ARN-ul extras a fost transcris invers folosind kit-ul de transcripție microARN TaqMan de la ThermoFischer Scientific din Waltham, Massachusetts, setul de primeri microARN TaqMan de la ThermoFischer Scientific din Waltham, Massachusetts, pentru cele patru miRNA selectate și miRNA-urile de referință U6 și RNU48.

Metoda $\Delta\Delta$ CT a fost utilizată pentru a examina valorile CT dobândite. Rezultatele au fost importate în programul GraphPad Prism versiunea 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, SUA) pentru analiza suplimentară.

Rezultate

Am găsit niveluri statistic semnificative pentru toate miARN testate atunci când am comparat mostrele tumorale cu cele normale adiacente pentru a evalua nivelurile relative de exprimare ale miARN testate. Cu valori p mai mici de 0,0001, 0,01, 0,0079 și 0,0172, analiza statistică a fiecărui miARN examinat a relevat faptul că miR-21-5p (26/7, 78,78%) și miR-93-5p (20/13, 60,60%) au fost supraexprimate, în timp ce miR-200c-3p (27/6, 81,81%) și miR-205-5p (29/4, 87,87%) au fost subexprimate.

Am descoperit că miR-21-5p a avut o AUC (aria sub curba caracteristică de funcționare a receptorului) mai mare de 0,7 când am analizat curbele ROC pentru miARN alese. Celelalte miARN-uri au avut o AUC mai mică.

Nu a existat o diferență statistic semnificativă între nivelele de expresie ale fumătorilor, foștilor fumători și nefumătorilor atunci când am examinat impactul fumatului asupra miARN-urilor.

Când am comparat cu țesutul normal, s-a găsit o corelație statistic semnificativă între expresia miARN-urilor miR-21-5p, miR-93-5p și miR-200c-3p și stadiul tumorii.

Au fost investigate țintele probabile ale miARN-urilor diferențial exprimate, deoarece miRNA-urile reglează expresia genelor lor țintă. În DIANA-miRPath, fiecare miARN avea gene țintă verificate experimental

Concluzii

Studiul actual a arătat că miR-21-5p și miR-93-5p au fost supraexprimate, în timp ce miR-200c-3p și miR-205-5p au fost subexprimate.

Nu s-a găsit nicio asociere între statusul de fumător și expresia dereglată a miARN-urilor investigate în OSCC.

Modificările la nivelul miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p și miR-205-5p ar putea fi identificate ca potențiale ținte pentru utilizare clinică în OSCC.

Validarea suplimentară ca biomarkeri moleculari pentru diagnosticul precoce, supravegherea prognosticului și medicația adecvată în cohorte mai largi de pacienți ar trebui luate în considerare.

Numeroase variabile tisulare, factori de mediu și caracteristici obișnuite precum statusul de fumător influențează variabilitatea OSCC cauzată de localizări diverse.

Cu o analiză suplimentară pe o cohortă mai mare, expresia diferențială a acestor transcripti la sub-site-uri ar putea acționa ca un marker diagnostic

Studiul 3 – Alterarea nivelurilor de expresie ale ARN-urilor lungi non-codificatoare H19 și MALAT1 în OSCC

Obiective

Elucidarea completă a mecanismelor moleculare ale ARN-urilor non-codificatoare, inclusiv a miARN-urilor și a lncARN-urilor, care stau la baza carcinogenezei și progresiei bolii în OSCC este o provocare. Acest studiu a avut ca scop evaluarea nivelurilor de expresie a H19 și MALAT1 în mai multe probe de țesuturi OSCC, în comparație cu țesuturile normale adiacente, prin utilizarea PCR în timp real (qRT-PCR), pentru a evalua un potențial panel de biomarkeri.

Un studiu de bioinformatică a evidențiat rețelele de reglementare lncARN-miARN-mARN implicate în OSCC. De asemenea, am investigat expresia de BCL2, TP53 și K167 pentru validarea la nivel proteic a elementelor cheie derivate din rețea.

Material și metodă

Pentru evaluarea lncARN-urilor și evaluarea genelor codificatoare s-a utilizat aceeași cohortă de pacienți ca și pentru studiul anterior.

Folosind kit-ul High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ARN-ul obținut a fost transcris invers pentru a evalua cantitatea de expresie a genei BCL2, lncARN-urilor H19 și MALAT1 și a altor gene (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA).

Pentru a evalua interacțiunea dintre H19 și MALAT1 cu miARN-uri, am folosit miRNET (<https://www.mirnet.ca>), un program online larg utilizat care permite vizualizarea rețelelor și analiza funcțională.

Expresia proteinelor K167, TP53 și BCL2 a fost evaluată folosind o procedură imunohistochimică convențională. Blocul tumoral care a reprezentat cel mai bine fiecare caz a fost ales din proba tumorală prelevată la momentul diagnosticului anatomopatologic înainte de tratament.

Rezultate

Comparând tumorile cu țesuturile normale învecinate, am descoperit niveluri relative de expresie statistic semnificative pentru lncARN examinate H19 și MALAT1. Comparativ cu mostrele normale, s-a constatat că mostrele analizate au avut niveluri mai mici de H19 și MALAT1. Am găsit un AUC mai mare de 0,7 pentru toate țintele atunci când am evaluat curba ROC a probelor studiate.

Folosind instrumentul de analiză a rețelelor din cadrul platformei software miRNET, intenționăm să precizem rețelele moleculare pentru a dezvolta potențiala aplicație în managementul cancerului oral a acestui transcript sau a moleculelor cu interacțiune directă. Aceste analize au sugerat că MALAT1 și H19 sunt

interconectate cu gene cheie (BCL2, VEGFA și TP53), care sunt recunoscute ca fiind implicate în prognosticul pacienților cu cancer. Componenta esențială a rețelei, țintită de către trei dintre miARN testate este BCL2. Având în vedere că BCL2 are un nivel scăzut de expresie, miR-21, gena cu cea mai mare expresie în cancerul oral, vizează direct BCL2.

S-a realizat o evaluare suplimentară prin qRT-PCR pentru a evalua nivelurile de expresie pentru BCL2 în același lot de pacienți, dezvăluind subexprimarea genei BCL2 în țesutul tumoral comparativ cu țesutul normal învecinat. Valorile AUC pentru această genă au cea mai mare valoare (0,8482), relevând rolul important al biomarkerilor pentru această genă pentru OSCC.

Expresia miR-205-5p a fost corelată direct și semnificativ statistic cu expresia miR-93-5p și miR-200c-3p.

Am evaluat, de asemenea, expresia KI67, TP53 și BCL2. Cele mai multe tumori au avut între 5 și 60% celule pozitive pentru KI67. Pentru proteina TP53, 15 mostre au avut TP53 mutat (2 mostre exprimând-o la 80%, 1 mostră la 95% și 11 mostre la 1%), iar nivelurile de expresie ale celor 7 mostre de tip sălbatic au variat între 15 și 65%. Când proteina BCL2 a fost colorată în secțiuni din 22 de tumori, o tumoră a avut o colorare clară citoplasmatică (90%), în 10 cazuri s-a observat o expresie a proteinei BCL2 cuprinsă între 10 și 35, iar în cazurile rămase nivelul de expresie a fost scăzut (0-5%).

Concluzii

MALAT1 și H19 au fost găsite a fi semnificativ subexprimate în tumorile OSCC comparativ cu țesutul normal adiacent, iar nivelurile lor de expresie au fost corelate negativ cu obiceiurile de fumat ale pacienților. Aceste lncARN-uri pot servi ca potențiale ținte diagnostice și terapeutice pentru OSCC.

Subexprimarea H19 în țesuturile tumorale OSCC este consistentă cu descoperirile în alte tipuri de cancer și cu examinarea noastră a tumorilor HNSCC din setul de date TCGA. Acest lucru sugerează că H19 poate juca un rol în dezvoltarea și progresia mai multor tipuri de cancer.

Rețeaua lncARN-miARN-mARN construită în OSCC oferă o nouă perspectivă pentru înțelegerea mecanismului molecular al acestei boli și poate oferi noi ținte terapeutice.

Analiza noastră a relevat o conexiune între BCL2 și VEGFA, două gene esențiale implicate în angiogeneză și apoptoză. Această descoperire oferă noi perspective asupra funcțiilor reglatoare ale acestor gene în biologia OSCC și poate duce la dezvoltarea unor tratamente mai eficiente pentru pacienții cu OSCC.

Studiul 4 – Modificări epigenetice în cancerul oral

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost de a identifica genele supresoare tumorale cel mai frecvent hipermetilate în probe de țesut tumoral recoltate de la pacienți cu carcinom oral cu celule scuamoase și de a determina dacă aceste informații se corelează cu ratele de supraviețuire.

Material și metodă

Unor pacienți care au beneficiat de tratament chirurgical pentru tumori orale benigne și maligne le-au fost prelevate probe de țesut tumoral și din țesuturile normale adiacente. Probele au fost obținute de la Clinica de Chirurgie Maxilo-Facială din Plovdiv, Bulgaria și de la Clinica de Chirurgie Oro-Maxilo-Facială II din Cluj-Napoca, România. Probele au fost colectate după aprobarea etică și consimțământul informat al pacienților.

ADN-ul genomic a fost extras folosind Kit-ul QIAamp DNA Mini (Qiagen), conform protocolului kit-ului adaptat din Manualul Qiagen pentru Kit-ul DNeasy Blood and Tissue (Catalog nr. 69504): Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol).

Sistemul Human Tumor Suppressor Genes EpiTectMethylqPCR Array, EAHS-551Z Qiagen a fost utilizat pentru a analiza starea de metilare a 24 de promotori de gene supresoare tumorale, care sunt frecvent descrise în literatură ca fiind hipermetilate în diferite tipuri de cancer, în ADN-ul genomic izolat din mostre de cancer oral cu celule scuamoase și țesuturi normale. Pentru a fi declanșat clivajul diferențial al secvențelor țintă care depinde de prezența sau absența citozinelor metilate în secvența lor de recunoaștere, sistemul EpiTect Methyl II PCR Array utilizează două endonucleaze de restricție distincte. Prin qRT-PCR, profilul de metilare al unei singure gene sau al unui grup de gene poate fi caracterizat în continuare.

Au fost utilizate șabloanele de analiză ale producătorului pentru a analiza datele. Aceste șabloane oferă starea de metilare a promotorului genei ca fracție de ADN care este nemetilată (FUM), intermediar metilată (FIM), metilată (FM) sau hipermetilată (FHM).

Rezultate

La nivelul genelor supresoare tumorale examinate, datele din cazurile de cancer oral au arătat o creștere a alterărilor tiparelor de metilare între țesuturile normale și cele maligne. Brca1, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Dapk1, Gstp1, Opml, Runx3, Sfrp2, Timp3 și Vhl au prezentat niveluri ridicate de metilare a promotorului (în medie peste 20% metilare) în țesuturile tumorale.

Folosind instrumentul online STRING 9.1 a fost creată o rețea utilizând lista genelor supresoare tumorale evaluate, pentru a identifica genele metilate relevante, cu semnificație în carcinogeneza orală. Aceste constatări ne-au permis să identificăm câteva gene pertinente a căror metilare a promotorului a fost legată de ratele de supraviețuire. Nucleul rețelei este reprezentat de CDH1 și CDH13, două molecule semnificative de adeziune celulară epitelială. Aceste gene supresoare tumorale sunt sugerate ca posibili biomarkeri în stadiile incipiente ale malignității, deoarece anumite căi sunt de asemenea activate, demonstrând tranziția de la tumori benigne la maligne.

Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier au fost evaluate folosind un tipar mediu de metilare a promotorului (în țesuturi normale și canceroase) pentru a distinge între tiparele de metilare scăzute și ridicate pentru fiecare probă investigată.

Tiparul de metilare pentru genele Ccnd2, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Neurog1 și Runx3 a fost legat semnificativ de rata de supraviețuire. În mod contrar, nu s-a găsit nicio asociere semnificativă statistic între rata de supraviețuire și BRCA1, Dapk1, Igf2, Opml, Prdm2, Vhl, Timp3 și Sfrp2.

Concluzii

Variabilitatea clinică a acestui tip de tumoră este cauzată de interdependența dintre modificările genetice și epigenetice, care afectează semnificativ prognosticul pacientului. Instrumentele de diagnostic convenționale pot fi îmbunătățite cu modificări moleculare la nivel genetic și epigenetic pentru a îmbunătăți precizia informațiilor de diagnostic și prognostic pentru anumite tipuri de tumori, cum ar fi OSCC.

Modificările genetice și epigenetice sunt strâns legate și pot avea un impact semnificativ asupra prognosticului pacientului în OSCC.

Starea de metilare a ADN-ului ar putea servi ca biomarker pentru ratele de supraviețuire în cazul OSCC, furnizând informații importante pentru tratamentul personalizat.

Modificările epigenetice, în special cele reversibile, pot fi utilizate pentru a dezvolta planuri de tratament personalizate pentru pacienții cu OSCC în stadiu incipient, pe baza studiului de metilare a promotorului genelor frecvent hipermetilate.

Cancerul oral prezintă semnături distincte de metilare care ar putea fi utilizate pentru a identifica pacienții care sunt susceptibili de a beneficia de abordări terapeutice țintite, bazate pe rețeaua interdependentă a genelor mutate și a genelor supresoare tumorale metilate.

Concluzii generale

1. Au fost realizate patru studii originale pentru identificarea modificărilor moleculare ale OSCC care au importante implicații în gestionarea OSCC.
2. Au fost caracterizate ncARN-urile cheie, evidențiind implicațiile acestora ca biomarkeri pentru OSCC.
3. Tehnologiile qRT-PCR/PCR-array și de imunohistochimie au fost utilizate pentru a identifica miARN-uri specifice, lncARN-uri și modele genice legate într-o rețea în OSCC.
4. Tehnologia PCR-array a fost utilizată pentru a identifica modificări epigenetice critice în genele supresoare tumorale implicate în OSCC.
5. Nivelurile de expresie a genelor codificatoare/non-codificatoare și modificările epigenetice sunt piese esențiale în puzzle-ul OSCC, implicând tumorigeneza, progresia tumorii și metastazele.
6. În primul studiu, o analiză bioinformatică a furnizat o listă de candidați lncARN pentru examinarea ulterioară a funcției și mecanismelor lor în cancerul oral.
7. Calea de semnalizare a ribonucleotidei reductazei a fost identificată ca o potențială zonă de interes în primul studiu.
8. În al doilea și al treilea studiu, s-a constatat că miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p, miR-205-5p și H19 și MALAT1 au un rol prognostic în OSCC.
9. Modificările identificate ale miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p, miR-205-5p, H19 și MALAT1 ar putea fi utilizate pentru dezvoltarea unor noi aplicații clinice în OSCC.
10. Identificarea modificărilor în miARN-uri și ncARN-uri ar putea fi deosebit de utilă atunci când este asociată cu markeri de imunohistochimie.
11. Acești noi markeri vor permite estimarea corectă a prognosticului persoanelor diagnosticate cu OSCC.
12. Investigarea ulterioară a genelor codificatoare și non-codificatoare poate permite rafinarea semnăturilor moleculare și a subtipurilor OSCC.
13. Investigarea ulterioară a genelor codificatoare și non-codificatoare poate permite dezvoltarea unor teste de prognostic mai bune pentru OSCC.
14. Investigarea ulterioară a genelor codificatoare și non-codificatoare poate permite prezicerea răspunsului la terapie pentru OSCC.
15. În al patrulea studiu, starea de metilare a promotorilor genelor supresoare tumorale selectate a fost evaluată prin tehnologia PCR-array.
16. Ccnd2, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Neurog1 și Runx3 furnizează informații prognostice importante la pacienții cu OSCC.
17. Genele supresoare tumorale identificate au fost conectate ca o rețea.
18. Rețeaua de gene supresoare tumorale identificată în cel de-al patrulea studiu ar putea fi utilă pentru dezvoltarea terapiilor țintite pentru OSCC.
19. Rețeaua de gene supresoare tumorale identificată în cel de-al patrulea studiu ar putea fi utilă pentru rafinarea semnăturilor moleculare și subtipurilor OSCC.
20. Rețeaua de gene supresoare tumorale identificată în cel de-al patrulea studiu ar putea fi utilă pentru dezvoltarea de teste prognostice mai bune și pentru a prezice răspunsul la terapie pentru OSCC.

PhD THESIS SUMMARY

Long non-coding RNAs in oral cancer

PhD student **Ovidiu Aghiorghiesei**

PhD coordinator **Radu Septimiu Câmpian, DDS, PhD**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
STATE OF THE ART	
1. Oral cancer	19
1.1. Diagnosis and clinical features	19
1.2. Molecular pathogenesis	20
1.3. Therapeutic options	22
2. Factors involved in oral cancer aetiology	25
2.1. Risk factors	25
2.2. Environmental factors	27
3. Molecular profiling of oral cancer: microRNAs	29
3.1. Non-coding RNAs	29
3.2. Long non-coding RNAs	29
3.3. MicroRNAs	31
3.4. MiRNAs in oral cancer	33
3.5. miR-21, miR-93, miR-200 family, miR-205 in oral cancer	34
4. Epigenetic alterations in oral cancer	37
4.1. DNA methylation in oral cancer	38
4.2. Histone modifications in oral cancer	40
4.3. ncRNAs and epigenetic alterations in oral cancer	41
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis	45
2. General methodology	47
3. Study 1 – Bioinformatic analysis of lncRNAs in oral cancer	49
3.1. Introduction	49
3.2. Aims	49
3.3. Materials and methods	49
3.4. Results	51
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	57
4. Study 2 – Dysregulation of miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p and miR-205-5p in oral squamous cell carcinoma	59
4.1. Introduction	59
4.2. Aims	60
4.3. Materials and methods	60
4.4. Results	63
4.5. Discussions	67
4.6. Conclusions	68
5. Study 3 – Long ncRNAs H19 and MALAT1 alteration of expression levels in OSCC	69

5.1. Introduction	69
5.2. Aims	69
5.3. Materials and methods	69
5.4. Results	71
5.5. Discussions	76
5.6. Conclusions	77
6. Study 4 – Epigenetic alterations in oral cancer	79
6.1. Introduction	79
6.2. Aims	80
6.3. Materials and methods	80
6.4. Results	83
6.5. Discussions	88
6.6. Conclusions	90
7. General conclusions	91
8. Originality and innovative contributions of the thesis	93
9. ACKNOWLEDGEMENTS	94
REFERENCES	95

Key words: Oral cancer, OSCC, long non-coding RNAs, microRNAs, molecular profiling, tumoral markers, epigenetic mechanisms, tumor supressor genes

INTRODUCTION

Advanced stage diagnosis is typical for oral cancer, but modern technologies can uncover molecular profiling information through genomic and epigenetic studies. This advancement can lead to an enhanced diagnosis and prognosis of this devastating disease.

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is a complex process with multiple stages that results in an intracellular microenvironment imbalance and various epigenetic, transcriptomic, and genetic alterations. Accumulating evidence indicates that non-coding RNAs (ncRNAs) such as microRNAs (miRNAs), long non-coding RNAs (lncRNAs), and other transcript types play a critical role in cellular processes, and the regulatory mechanisms of ncRNAs can interact with diverse species of molecules through various molecular mechanisms. This regulatory network is also applicable for OSCC, as studied in this thesis.

Numerous studies have shown that altered expression levels of several ncRNAs are closely correlated with cancer pathogenesis and disease progression in OSCC. However, no perfect diagnostic marker has been found for OSCC. Some lncRNAs with aberrant expression have been tested as therapeutic targets and were closely correlated with cancer prognosis.

The thesis work began with theoretical data, and oral cancer is a leading cause of incidence and mortality worldwide. The original work is structured around four studies. The first study involved bioinformatic analysis, which produced a list of lncRNA candidates for further investigation of their role and mechanisms in oral cancer, with a particular focus on those controlling the Ribonucleotide Reductase Signaling pathway.

The second study evaluated a panel of miRNAs (miR-93-5p, miR-200c-3p, miR-21-5p, and miR-205-5p). The third study focused on evaluating two critical lncRNAs (H19 and Malat1), then generated a network among these non-coding transcripts and validated the most relevant target gene-BCL2 at mRNA and protein level K167, TP53, and BCL2. Additionally, a network was developed among the non-coding and coding genes evaluated in OSCC.

The last study focused on the aberrant promoter methylation of a panel of 22 tumor suppressor genes, emphasizing the correlation with overall survival rates and interconnections as a network.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1 - Bioinformatic analysis of lncRNAs in oral cancer

Aims

The aims of our study were to emphasize some key lncRNAs, summarizing their dysregulation and potential mechanisms, targeting oncogenic signaling pathways and their possible clinical application using online tools like miRNET or Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Material and methods

TCGA data set downloading. The data for oral cancer were extracted from the Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, comprising 519 tumor and 44 normal tumor-adjacent tissue samples. The raw data are downloaded from the University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser.

Bioinformatic analysis of the most relevant lncRNAs in oral cancer. The analysis of the altered lncRNAs in oral cancer was done using the Gene Spring GX v.14.9 (Santa Clara, USA), using volcano plot, fold change (FC) cut-off of ± 2 , T Test unpaired and applying false discovery rate (FDR) correction. The bioinformatics analyses for differential expression were performed in the case of tumor tissue ($n = 321$) versus normal tissue ($n = 30$).

IPA network analysis. To identify key molecules or transcripts associated with selected lncRNA, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood, CA, USA; www.ingenuity.com) was used, considering all the information available in this database, manually curated.

miRNA-lncRNA- interactions using miRNET. To evaluate the interaction of CASC9, LINP1, LSTR, HCP5, DANCR, and HCG22 with miRNA miRNET (<https://www.mirnet.ca>), a widely used online program that permits the visualization network and functional analysis, was used.

Results

In the bioinformatics analysis on the TCGA patient cohort, in tumor tissues ($n = 321$) versus normal tissues ($n = 30$), we identified 15 upregulated genes and 20 downregulated lncRNAs considered as cut-off the fold change (FC) values of ± 2 and p -value ≤ 0.05 (Benjamini-Hochberg correction).

Using the network analysis tool within the IPA software platform, we intend to predict the molecular networks to further the potential application in oral cancer management of these transcripts or direct interacting molecules. These analyses suggested that altered lncRNAs in oral cancer are interconnected with key genes integrated as a network related to Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Cellular Movement or related to Gene Expression, Infectious Diseases, Organismal Development. An important enrichment pathway is related to the Ribonucleotide Reductase Signaling pathway

The construction of the lncRNAs-miRNA regulatory Network interactions between lncRNA and miRNA is an increasing focus of research attention. To further explore the functions of hub lncRNA from a global perspective, a lncRNAs-miRNA network was generated via miRNet, emphasizing complex regulatory networks among the ncRNAs.

Conclusions

This study emphasizes the potential of lncRNAs as biomarkers for diagnosis or therapeutics. Our data can deliver a valuable list of lncRNA candidates for an additional examination of their function and mechanisms in oral cancer.

Deciphering the mechanisms by which lncRNAs affect tumor growth, particularly those involved in the Ribonucleotide Reductase Signaling pathway, is crucial for improving cancer diagnosis and treatment.

Targeting these lncRNAs with novel therapeutic approaches could lead to the development of more effective treatments for cancer patients, emphasizing the potential of lncRNAs as a valuable target for cancer research.

Studying the role of lncRNAs in cancer is a promising avenue for improving cancer care. By identifying specific lncRNAs involved in the Ribonucleotide Reductase Signaling pathway, we can develop targeted therapies that address the underlying molecular mechanisms of cancer growth and improve patient outcomes.

Study 2 - Dysregulation of miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p and miR-205-5p in oral squamous cell carcinoma

Aims.

By using real-time PCR (qRT-PCR), this study sought to determine the expression levels of four miRNAs (miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p, and miR-205-5p) in tissue samples from OSCC and normal neighboring tissues in order to determine whether they would make up a potential panel of biomarkers.

Material and methods

A cohort of 33 patients with oral squamous cell carcinoma was included in this investigation. We had fresh frozen tumors and their associated adjacent normal tissue for the 33 patients. Using standards that have gained international acceptance, the diagnosis was confirmed. All participants in the study provided their informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethical Review Board of the "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania, approval no 147/06.05.2019.

RNA extraction from the fresh frozen tissues was conducted using the classical phenol-chloroform method after homogenization of the tissue in 800 μ l TripleXtractor (Grisp, Porto, Portugal).

The quantity of the obtained RNA was measured using the NanoDrop spectrophotometer. Out of a volume of 1 μ l of the sample nucleic acid, the NanoDrop spectrophotometer can measure the spectrogram between 220-750 nm.

The extracted RNA was reverse transcribed using the TaqMan MicroRNA Transcription kit from ThermoFischer Scientific in Waltham, Massachusetts, the TaqMan microRNA primer assay from ThermoFischer Scientific in Waltham, Massachusetts, for the four selected miRNAs and the housekeeping miRNAs U6 and RNU48.

The $\Delta\Delta$ CT method was used to examine the acquired CT values. The results were imported into the GraphPad Prism program version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) for additional analysis.

Results

We found statistically significant levels for all tested miRNAs when comparing tumor vs normal adjacent samples in assessing the tested miRNAs' relative expression levels.

With p values of <0.0001, 0.01, 0.0079, and 0.0172, statistical analysis of each examined miRNA revealed that miR-21-5p (26/7, 78.78%) and miR-93-5p (20/13, 60.60%) were upregulated, while miR-200c-3p (27/6, 81.81%) and miR-205-5p (29/4, 87.87%) were downregulated.

We discovered that miR-21-5p had an AUC (area under the ROC curve) greater than 0.7 when we analyzed the ROC (receiver operating characteristic) curves for the chosen miRNAs. The other miRNAs had a lower AUC.

There was no statistically significant difference in the expressions of smokers, former smokers, and non-smokers when we examined the impact of smoking on miRNAs.

When compared to normal tissue, a statistically significant correlation was found between the expression of the miRNAs miR-21-5p, miR-93-5p, and miR-200c-3p and tumor stage.

The probable targets of the differentially expressed miRNAs were investigated because miRNAs regulate the expression of their target genes. In DIANA-miRPath, every miRNA had experimentally verified miRNA target genes.

Conclusions

The current study showed that miR-21-5p and miR-93-5p were upregulated, whereas miR-200c-3p and miR-205-5p were downregulated.

No association between OSCC tobacco/smoking status and dysregulated expression of the investigated miRNAs was found.

MiR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p, and miR-205-5p alterations could be identified as potential targets for clinical usage in OSCC.

Additional validation as molecular biomarkers for early diagnosis, prognosis surveillance, and suitable medication in broader patient cohorts should be considered.

Numerous tissular variables, environmental factors, and habitual characteristics like smoking status all impact the variability of OSCC caused by diverse locations.

With more analysis on a larger cohort, differential expression of these transcripts at sub-sites might act as a diagnostic marker.

Study 3 – Long ncRNAs H19 and MALAT1 alteration of expression levels in OSCC

Aims

Fully elucidating the molecular mechanisms of ncRNAs, including miRNAs and lncRNAs, underlying OSCC carcinogenesis and disease progression is challenging. This study aimed to evaluate the expression levels of H19, and MALAT1 in several tissue samples of OSCC, as compared to normal adjacent tissues, by real-time PCR (qRT-PCR) to assess a potential biomarkers panel. A bioinformatics study emphasised the lncRNA-miRNA-mRNA regulatory networks involved in OSCC. We also investigated the expression of BCL2, TP53 and K167 for protein-level validation of key elements derived from the network.

Material and methods

For the evaluation of lncRNAs and coding gene evaluation was used same patient cohort as for the miRNA study.

Using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, the obtained RNA was reverse transcribed to assess the amount of expression of the BCL2 gene, H19 and MALAT1 lncRNAs, and other genes (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA).

To evaluate the interaction of H19 and MALAT1 with miRNA, we used miRNET (<https://www.mirnet.ca>), a widely used online program that permits the visualisation network and functional analysis.

The expression of the proteins K167, TP53, and BCL2 was evaluated using a conventional immunohistochemical procedure. The tumor block that best represented each case was chosen from the tumor sample taken at the time of the anatomopathological diagnosis before treatment.

Results

When comparing tumours with normal neighbouring tissues, we found statistically significant relative expression levels for the examined long non-coding RNAs H19 and MALAT1. Compared to normal samples, it was found that the analysed samples had lower levels of H19 and MALAT1. We found an AUC over 0.7 for all targets when assessing the studied samples' ROC (receiver operating characteristic) curve.

Using the network analysis tool within the miRNET software platform, we intend to predict the molecular networks to further the potential application in oral cancer management of this transcript or direct interacting molecules. These analyses suggested that MALAT1 and H19 are interconnected with key genes

(BCL2, VEGFA and TP53), which are recognized to be involved in patients' prognostic in cancer. The essential component of the network that three of the tested miRNAs are targeting is BCL2. Given that BCL2 has a low level of expression, miR-21, a gene with the highest expression in oral cancer, directly targets BCL2.

Additional evaluation by qRT-PCR was done to assess the expression levels for BCL2 in the same patient cohort, revealing the downregulation of the BCL2 gene in tumor tissue compared to normal adjacent tissue. AUC values for this gene have the highest value (0.8482), revealing the important role of biomarkers for this gene for OSCC.

MiR-205-5p expression was directly statically significantly correlated with miR-93-5p and miR-200c-3p expression.

We also assessed the expression of KI67, TP53, and BCL2 in light of the network in Figure 13. Most tumors had 5 to 60% of KI67-positive cells. For the TP53 protein, 15 samples have mutant TP53 (2 samples expressing it at an 80%, 1 sample at a 95 %, and 11 samples at a 1%), and the expression levels of the 7 wild-type samples ranged from 15 to 65%. When the BCL2 protein was stained in sections from 22 tumors, one tumor had a clear cytoplasmic staining (90 %), 10 other instances had BCL2 expression ranging from 10 to 35, and the remaining cases had low expression levels (0-5%).

Conclusions

MALAT1 and H19 were found to be significantly downregulated in OSCC tumors compared to nearby normal tissue, and their expression levels were negatively correlated with patients' smoking habits. These lncRNAs may serve as potential diagnostic and therapeutic targets for OSCC.

The downregulation of H19 in OSCC tumor tissues is consistent with findings in other cancer types and our examination of HNSCC tumors in the TCGA dataset. This suggests that H19 may play a role in the development and progression of multiple cancer types.

The lncRNA-miRNA-mRNA network constructed in OSCC provides a new perspective for understanding the molecular mechanism of this disease and may offer novel therapeutic targets.

Our analysis revealed a connection between BCL2 and VEGFA, two essential genes involved in angiogenesis and apoptosis. This finding provides new insights into the regulatory functions of these genes in OSCC biology and may lead to the development of more effective treatments for OSCC patients.

Study 4 - Effect of epigenetic alterations on oral cancer

Aims

Our study aimed to determine which OSCC tumor suppressor gene promoters were most frequently hypermethylated and whether this information correlated with patient survival.

Materials and methods

Patients who received surgical treatment for benign and malignant oral tumors had tissue samples taken from the tumour and the surrounding normal tissues. The samples were obtained from the Plovdiv Maxillofacial Surgery Clinic in Bulgaria, and the Oral Maxillofacial Surgery Clinic II in Cluj-Napoca, Romania. Samples were collected after ethical approval and patient signatures providing consent for each trial participant.

Genomic DNA was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), according to the kit's protocol adapted from the Qiagen handbook for the DNeasy Blood and Tissue Kit (Catalog no 69504): Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol).

Human Tumor Suppressor Genes EpiTectMethylqPCR Array system, EAHS-551Z Qiagen was used to analyze the methylation status of 24 tumor suppressor gene promoters, which are frequently described in the

literature as being hypermethylated in various types of cancer, in the genomic DNA isolated from normal and tumor oral squamous cancer samples. For differential cleavage of target sequences that depend on the presence or absence of methylated cytosines in their recognition sequence to be triggered, the EpiTect Methyl II PCR Array System employs two distinct restriction endonucleases. With qRT-PCR, the methylation profile of a single gene or a group of genes can be further characterized

The producer's analysis templates were used to analyze the data. These templates offer the methylation state of the gene promoter as a fraction of DNA input that is unmethylated (FUM), intermediately methylated (FIM), methylated (FM), or hypermethylated (FHM).

Results

At the level of the examined tumor suppressor genes, clustering data from the patients with oral cancer revealed an increase in methylation pattern alterations between normal and malignant tissues. Brca1, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Dapk1, Gstp1, Opcml, Runx3, Sfrp2, Timp3, and Vhl are shown to have high levels of promoter methylation (an average of over 20 percent methylation) in tumor tissues.

Using the online tool STRING 9.1 a network was created utilizing the list of the evaluated tumor suppressor genes in order to find the relevant methylated genes with significance in oral carcinogenesis. These findings allowed us to pinpoint a few pertinent genes whose promoter methylation was connected with survival rates. The network core is represented by CDH1, and CDH13, two significant epithelial cell adhesion molecules. These tumor suppressors are suggested as possible biomarkers in the early stages of malignancy since particular pathways are also activated, demonstrating the change from benign to malignant tumors.

Kaplan-Meier survival curves were assessed using an average promoter methylation pattern (in both normal and cancerous tissue) to distinguish between low and high methylation patterns for each investigated sample.

The methylation pattern for the genes Ccnd2, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Neurog1 and Runx3 was substantially linked with the survival rate. Contrarily, no statistically significant association was found between the survival rate and BRCA1, Dapk1, Igf2, Opcml, Prdm2, Vhl, Timp3, and Sfrp2.

Conclusions

The clinical variability of this tumor type is caused by the interdependency between genetic and epigenetic modifications, which also significantly impacts patient prognosis. Conventional diagnostic tools can be enhanced with molecular alterations at the genetic and epigenetic levels to improve accuracy of diagnosis and prognosis information for certain tumor types, such as OSCC.

Genetic and epigenetic modifications are closely linked and can significantly impact patient prognosis for OSCC.

DNA methylation state could serve as a biomarker for OSCC survival rates, providing important information for personalized treatment.

Epigenetic modifications, specifically reversible modifications, can be used to develop tailored treatment plans for early-stage OSCC patients, based on promoter methylation study of commonly hypermethylated genes.

Oral cancer exhibits distinct methylation signatures that could be used to identify patients who are likely to benefit from targeted therapeutic approaches based on the interdependent network of mutated genes and methylated tumor suppressor genes.

General conclusions

1. Four original studies have been conducted to identify OSCC molecular alterations that have important implications in OSCC management.

2. Key ncRNAs have been characterized, highlighting their implications as biomarkers for OSCC.
3. qRT-PCR/PCR-array and immunohistochemistry technologies were used to identify specific miRNAs, lncRNAs, and gene patterns linked in a network in OSCC.
4. PCR-array technology has been used to identify critical epigenetic alterations in tumor suppressor genes involved in OSCC.
5. Coding/non-coding gene expression levels and epigenetic alterations are essential pieces in the OSCC picture's puzzle, involving tumorigenesis and tumor progression and metastasis.
6. In the first study, a bioinformatic analysis provided a list of lncRNA candidates for further examination of their function and mechanisms in oral cancer.
7. The Ribonucleotide Reductase Signaling pathway was identified as a potential area of focus in the first study.
8. In the second and third studies, miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p, miR-205-5p, and H19 and MALAT1 were found to have a prognostic role in OSCC.
9. The identified alterations of miR-21-5p, miR-93-5p, miR-200c-3p, miR-205-5p, H19, and MALAT1 might be used for developing novel clinical applications in OSCC.
10. The identification of alterations in miRNAs and ncRNAs might be particularly useful when associated with immunohistochemistry markers.
11. These new markers will allow for the correct estimation of the prognosis of individuals diagnosed with OSCC.
12. Further investigation of coding and non-coding genes may allow the refinement of molecular signatures and subtypes of OSCC.
13. Further investigation of coding and non-coding genes may allow the development of better prognostic tests for OSCC.
14. Further investigation of coding and non-coding genes may allow the prediction of response to therapy for OSCC.
15. In the fourth study, the methylation status of selected tumor suppressor gene promoters was assessed by PCR-array technology.
16. Ccnd2, Chd1, Cdh13, Cdkn1c, Neurog1, and Runx3 provide important prognostic information in OSCC patients.
17. The identified tumor suppressor genes were connected as a network.
18. The network of tumor suppressor genes identified in the fourth study might be useful for developing targeted therapies for OSCC.
19. The network of tumor suppressor genes identified in the fourth study might be useful for refining molecular signatures and subtypes of OSCC.
20. The network of tumor suppressor genes identified in the fourth study might be useful for developing better prognostic tests and predicting response to therapy for OSCC.