

---

TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

# Rolul ARN-urilor necodificatoare și circulare în cancer

---

Doctorand **Rareș-Constantin Drula**

---

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

---

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Cancer</b>	19
1.1. Cancerul de sân	19
1.1.1. Abordări terapeutice în cancerul de sân	21
1.1.2. Calea de semnalizare a estrogenului	22
1.1.3. Implicațiile semnalizării estrogenului în oncogeneza cancerului de sân	22
1.2. Cancerul pulmonar	24
<b>2. ARN-uri necodante și ARN-uri circulare</b>	27
2.1. miARN-uri	27
2.1.1. Implicarea patologică a miARN-urilor	28
2.1.2. miARN și semnalizarea estrogenului în cancerul de sân	29
2.1.3. Caracteristicile funcționale ale miARN-urilor în cancer	30
2.2. lncRNAs	31
2.3. ARN-urile circulare	31
2.3.1. Biogeneza circARN	32
2.3.2. Funcțiile circARN	33
2.3.3. Metode de detectare și adnotare circARN	34
<b>3. Interacțiunea miARN-circARN în cancer</b>	37
3.1. ARNm țintă circRNA-miRNA în cancerul mamar și pulmonar	37
<b>4. Veziculele extracelulare</b>	41
4.1. Biogeneza EV	41
4.2. Compoziția și încărcarea încărcăturii EV	42
4.3. Încărcarea miARN în VE și potențialul lor de biomarker.	43
4.4. Implicarea EV în procesele oncogene	45
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza și obiectivele studiului</b>	49
<b>2. Metodologia și designul studiului</b>	51
<b>3. Studiul nr.1 – Rolul Estrogenului (17B-Estradiol) în producerea de EV în celulele tumorale de sân ER+</b>	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteză	53
3.3. Materiale și metode	53
3.4. Rezultate	56
3.4.1. Evaluarea rolului estrogenului asupra producției de EV în modelele ER+, TNBC și linii celulare normale	56
3.4.2. Aspectele morfologice și natura veziculelor identificate.	59
3.4.3. Dependența mecanismului observat de activitatea ER	62
3.4.4. Perspective asupra posibilului model de biogeneză VE	62

3.5. Discuții	62
3.6. Concluzie	63
<b>4. Studiul nr.2 – Rolul estrogenului în modularea miRNomei celulare și extraveziculare și a producției de vezicule în modelele de cancer mamar ER+</b>	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteză	65
4.3. Materiale și metode	66
4.4. Rezultate	68
4.4.1. Evaluarea semnăturilor miARN-urilor celulare și derivate din EV ER+ și TNBC folosind Microarray	68
4.4.2. Validarea qRT-PCR a miARN-urilor celulare și EV exprimate diferențial selectate	72
4.4.3. Validarea reglării miR-149-5p și investigarea bioinformatică a interacțiunilor genomice ale ER	73
4.4.4. Perspective asupra interacțiunii funcționale dintre miR-149-5p și hnRNPA1 în reglarea biogenezei EV și a încărcării miARN-urilor	74
4.5. Discuții	77
4.6. Concluzie	78
<b>5. Studiul nr.3 – Detectarea și validarea circRNA folosind RT-qPCR în modele de cancer pulmonar</b>	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteză	79
5.3. Materiale și metode	80
5.4. Rezultate	81
5.4.1. Construcția circRNA in silico, proiectarea și validarea amorzelor	81
5.4.2. Optimizarea tratamentului cu ARNza R și efectul asupra detectării circRNA	84
5.4.3. Protocol optimizat de detectare a circRNA folosind qRT-PCR	87
5.4.4. Predicția sponging bioinformatică circRNA-miRNA și constrângerea rețelelor circRNA-miRNA-mRNA.	89
5.5. Discuții	91
5.6. Concluzie	92
<b>6. Discuții generale</b>	93
<b>7. Observații finale</b>	95
<b>8. Originalitatea tezei și contribuțiile la domenii</b>	97
<b>REFERINȚE</b>	99

---

# INTRODUCERE

Fundamentarea biologiei moleculare ca știință de sine stătătoare în ultima parte a secolului XX a deschis calea înțelegerii mai profunde a geneticii și a proceselor celulare. În plus, capacitatea de a manipula direct ADN-ul și ARN-ul, combinată cu progresele tehnologice rapide, au permis descifrarea proceselor moleculare subiacente asociate patologiilor. Cercetarea oncologică, în special, a înregistrat o multitudine de descoperiri în identificarea fundemetelor genetice ale bolii, a factorilor de risc, a biomarkerilor bolii și, probabil cel mai important, a unor terapii eficiente. Ca atare, caracterizarea moleculară a proceselor oncologice a fost direcția principală de cercetare pe care s-au bazat cele mai importante din aceste descoperiri terapeutice. Cu toate acestea, deși au existat îmbunătățiri majore în abordările terapeutice ale majorității tipurilor de cancer, înțelegerea noastră a acestui grup extrem de eterogen de afecțiuni maligne este încă doar la început.

Cancerul mamar și pulmonar sunt două dintre cele mai răspândite și letale forme, care afectează milioane de persoane din întreaga lume. În ciuda progreselor înregistrate în înțelegerea bolii și a dezvoltării diferitelor opțiuni de tratament, prognosticul pentru pacienții cu stadii avansate rămâne nefavorabil. Prin urmare, este crucial să continuăm să dezvoltăm mecanismele moleculare care stau la baza dezvoltării și progresiei acestor tipuri de cancer pentru a îmbunătăți capacitatea noastră de a dezvolta terapii noi. În conformitate cu acest aspect, taxonomia moleculară actuală a cancerului de sân a fost stabilită pe baza expresiei receptorilor săi hormonal și a caracteristicilor transcripționale pe care aceștia le coordonează. Estrogenul este cel mai important hormon sexual și joacă un rol crucial în dezvoltarea cancerului de sân receptor estrogen pozitiv (ER+), cel mai frecvent subtip, reprezentând mai mult de 60% din cazurile BC. Caracterizarea căii de semnalizare a estrogenului a fost un pilon de bază în identificarea unor terapii pentru acest subtip de cancer, molecule precum tamoxifen fiind specific definite ca inhibitori hormonal. Cu toate acestea, în ciuda succesului inițial al acestor terapii, mulți pacienți dezvoltă în cele din urmă rezistență, subliniind necesitatea unei mai bune înțelegeri a mecanismelor moleculare care stau la baza interacțiunii dintre estrogen și celulele canceroase de sân. Deși este bine cunoscut faptul că estrogenul este unul dintre principalii factori ai dezvoltării cancerului ER+, întreaga activitate reglatoare ale acestui hormon nu au fost încă descifrate.

Veșiculele extracelulare (VE) sunt particule membranate mici, eliberate de celule în spațiul extracelular, reprezentând unul dintre principalele canale de comunicare intercelulară. Încărcătura VE conține o multitudine de molecule bioactive, de la ADN, diferite specii de ARN și proteine, care pot modifica fenotipic celulele în care acestea sunt internalizate. Ca atare, s-a dovedit că VE-urile joacă un rol important în comunicarea dintre celulele tumorale și micromediul lor, facilitând diseminarea metastatică a celulelor acestora.

Dintre multiplele componente ale încărcăturii moleculare VE, au fost evidențiate miARN (microARN), molecule mici de ARN care joacă un rol critic în reglarea genelor, având în vedere versatilitatea lor funcțională extinsă și asocierea istorică cu oncogeneza. Până acum, o conexiune între estrogen și miARN-urile încapsulate în EV nu a fost conturată. Prin urmare, unul dintre primele obiective ale acestei teze este de a contribui la înțelegerea rolului micrARN-urilor în conjuncție cu activitatea estrogenică în cancer, a veziculelor extracelulare, și a mecanismelor de încărcare a miARN-ului acestora.

CircARN-urile, pe de altă parte, sunt molecule de ARN cu o arhitectură circulară rezultată din fuzionarea capetelor unui transcript de ARN imatur în urma unui proces numit back-splicing. Din punct de vedere funcțional, deși au un potențial codant limitat, circARN-urile s-au dovedit a fi importante în reglarea expresiei genelor, acționând ca schele pentru complexe proteice și momeli monocatenare pentru miARN-uri, putându-le inactiva. Astfel, cercetarea CircRNA a avansat rapid în ultimii câțiva ani, cu un număr tot mai mare de studii care sugerează un rol potențial pentru aceste specii de ARN în biologia cancerului. Domeniul de studiu al circARN-urilor fiind relativ tânăr, multe aspecte refritoare la analiza și caracterizarea moleculară a acestora nu au fost încă bine definite. Acest lucru poate face dificilă compararea rezultatelor din diferite studii și tragerea de concluzii despre rolul circRNA în cancer, rezultând în disconcordanțe și punând sub semnul întrebării importanța lor funcțională. Prin legarea de miARN-uri specifice, circARN-urile pot modula expresia genelor țintă implicate în tumorigeneză, angiogeneză și rezistență la terapie. În plus, s-a demonstrat că circRNA-urile au modele de expresie specifice în cancerul pulmonar, sugerând utilizarea lor potențială ca biomarkeri pentru diagnostic și prognostic.

Prin urmare, ne vom concentra pe aspectele bioinformatică și experimentale în detectarea și caracterizarea unui subset de circRNA în modelele de cancer pulmonar, utilizând toate resursele online disponibile și tehnicile experimentale și de control al calității pentru a contribui la definirea unui consens metodologic. Vom evidenția modul în care pașii cheie de procesare, cum ar fi digestia ARN-azei R a transcriptelor liniare, pot îmbogăți în mod specific fracția circARN-urilor din ARN-ul total, facilitând detectarea lor. Astfel, prin această teză ne propunem să contribuim la înțelegerea rolului ARN-urilor necodificante, în special miARN-urilor, în cancer prin realizarea a trei studii care investighează rolul estrogenului în modularea producției de vezicule extracelulare și a semnăturilor miARN, precum și stabilirea unui protocol pentru detectarea circRNA în celulele canceroase. Aceste studii vor oferi perspective asupra interacțiunii complexe dintre hormoni, ARN-urile necodificatoare și cancer și pot informa dezvoltarea unor noi strategii terapeutice.

---

## Contribuția personală

### Studiul #1. Rolul estrogenului (17 $\beta$ -estradiol) în producerea de VE în modele tumorale de sân ER+

Prima componentă a acestui studiu își propune să evalueze rolul estrogenului în producerea veziculelor extracelulare (VE) în celulele tumorale de sân positive, triple negative și în celulele mamare cu fenotip normal. Pentru a face acest lucru, vom cultiva aceste tipuri de celule în prezența și în lipsa totală a estrogenului din mediu. Supernatantul va fi colectat și procesat pentru purificarea VE folosind o metodă adecvată pentru a produce citiri precise. VE-urile purificate vor fi numărate folosind Nanosight 3000, o platformă utilizată pe scară largă pentru caracterizarea nanoparticulelor din biofluide, iar rezultatele vor fi analizate pentru a determina efectul estrogenului asupra producției de EV în diferitele tipuri de celule.

În conformitate cu obiectivul nostru, rezultatele noastre au arătat că stimularea cu estrogen determină o creștere semnificativă a producției de EV în toate liniile celulare ER pozitive investigate, fără modificări semnificative în cazul modelelor ER negative. Analiza morfologică a EV-urilor identificate folosind atât microscopia Nanosight, cât și TE a confirmat distribuția dimensiunilor corespunzătoare exozomilor, indicând un mecanism de eliberare activ care poate fi supus reglementării. Inhibarea dublă a activității ER: tamoxifenul, cel mai utilizat antagonist ER, și knockdown-ul ER siRNA au confirmat legătura dintre inhibarea semnalizării ER și biogeneza EV. Acest lucru sugerează în mod clar că mecanismul de producere a EV este diferit între subtipurile moleculare și că calea estrogenului este implicată în mod specific în reglarea producției de EV. În plus, am indicat că nSMase2, enzimă implicată în metabolismul ceramidelor, este implicată la mecanismul observat, având în vedere efectul inhibitor al moleculei inhibitoare GW4869 și contracararea acesteia după adăugarea de estrogen într-un mecanism nedescifrat în prezent.

Din observațiile noastre, legătura dintre estrogen și VE este o descoperire nouă; ca atare, descrierea completă a mecanismului implicat ar putea oferi oportunități terapeutice, având în vedere implicațiile largi ale EV în dezvoltarea fenotipurilor maligne. Rezultatele noastre oferă noi perspective asupra relației dintre semnalizarea hormonală și producția de EV în celulele tumorale de sân și subliniază importanța înțelegerii diferitelor mecanisme prin care hormonii reglează producția de EV. Descoperirile noastre ar putea avea implicații semnificative pentru diagnosticul și tratamentul cancerului de sân, deoarece EV-urile au potențialul de a servi ca biomarkeri diagnostici și terapeutici. În plus, țintirea căii estrogenului în celulele tumorale de sân ER pozitive folosind tamoxifen sau siRNA knockdown ar putea oferi o nouă strategie terapeutică pentru tratamentul cancerului de sân prin reducerea producției de EV, care ar putea avea un impact încă neexplorat asupra răspândirii și rezistenței celulelor canceroase.

## **Studiul #2. Rolul estrogenului în modularea miRNOM-ului celular, extravezicular și a încărcării miARN-urilor în VE derivate din modelele celulare tumorale.**

În studiul anterior, am raportat că estrogenul modulează producția de vezicule în celulele tumorale de sân estrogen-pozitive. Pe lângă efectele sale asupra proliferării celulare și producției de VE, s-a demonstrat că estrogenul reglează expresia anumitor miARN. În acest capitol, vom investiga ipoteza că estrogenul modulează semnătura miARN-urilor la nivel celular cât și a VE-urilor derivate din modelele celulare tumorale.

În decursul acestui studiu, am evidențiat un mecanism nou în care estrogenul poate regla semnătura încărcăturii miARN printr-o rețea complexă de interacțiune.

În primul rând, folosind microarray, am observat că semnătura diferențială EV miARN a prezentat elemente recurente derivate din aceeași familie de miARN, și anume let-7, care a fost primul indiciu al unui mecanism de reglementare comun, și miR-149-5p la nivel celular, observații validate ulterior folosind qRT-PCR. Am confirmat utilizând date bioinformatică genomice că ER, după activare, poate fi responsabil pentru inhibarea miR-149-5p, având în vedere prezența unui locus de legare specifică ER în regiunea promotoare din amonte de 5 kb. Prin urmare, ER ar putea lega acest locus după activare, inhibând transcripția miR-149-5p. Am fost curioși de consecințele funcționale ale reglării miR-149-5p, prin cautarea unui ARNm țintă cu implicații funcționale fie în biogeneza EV, fie, în mod ideal, încărcarea miARN în mecanismele EV. Am identificat hnRNPA1 RBP și factorii de transcripție SP1 ca ținte potențiale ale miR-149-5p. Prima țintă, SP1 este un factor de transcripție implicat în transcrierea mai multor componente ale căii de biogeneza a EV, în special nsMASE2. Acest lucru implică faptul că inhibarea miR-149-5p poate determina o creștere a transcripției SP1, determinând în consecință reglarea nsMASE2. NsMASE2 este un factor cheie în metabolismul ceramidelor și în mașinile de biogeneza EV. Aceasta, împreună cu identificarea conexiunii sale cu SP1 și indirect cu miR-149-5p, conturează o potențială axă de reglare dependentă de estrogen care modulează biogeneza EV în celulele ER + BC.

Pe de altă parte, interacțiunea dintre hnRNPA1 și miR-149-5p a fost validată anterior. Astfel, am ales să validăm hnRNPA1 ca potențial factor implicat în încărcarea membrilor familiei let-7 miARN în EV, având în vedere indicațiile anterioare ale proteinelor din aceeași familie cu activitate similară. Am observat o creștere a nivelelor de hnRNPA1 în urma tratamentului cu 17 $\beta$ -estradiol în celulele ER +, așa cum s-a indicat anterior în urma reglajului miR-149-5p dependent de ER. Studiile anterioare au indicat că membrii familiei hnRNP leagă ARN-urile țintă pe baza prezenței unor motive specifice în secvența lor, fapt care a acționat ca bază a presupunerii noastre că hnRNPA1 poate interacționa direct cu let-7. Astfel, am confirmat co-localizarea hnRNPA1 cu let-7 în VE-urile derivate din liniile celulare BC folosind Western Blot. Am identificat secvența de legare comună găsită la majoritatea membrilor familiei let-7a. Am validat interacțiunea directă dintre hnRNPA1 și let-7a și let-7d folosind un pulldown direct proteină-ARN biotină-streptavidină. Ca atare, am confirmat legarea directă a let-7a și let-7d cu hnRNPA1. Aceasta subliniază o interacțiune extinsă

---

dependentă de estrogen care ar putea regla expulzarea miARN-urilor considerate în mare ca fiind supresoare tumorale. Implicațiile extinse ale let-7 în suprimarea tumorale pot constitui fundamentul unui studiu ulterior. Astfel, acest studiu subliniază un nou mecanism dependent de estrogen care corelează reglarea expresiei miR-149-5p cu încărcarea specifică a miARN în EV-uri și, eventual, cu biogeneza VE.

### **Studiu #3 Optimizarea unui protocol pentru detectarea circRNA folosind qRT-PCR**

Protocoalele fiabile și replicabile pentru detectarea circRNA-urilor folosind RT-PCR sunt cruciale pentru caracterizarea precisă a acestor transcripte. Având în vedere complexitatea protocoalelor circRNA în comparație cu cele standard RT-PCR, există multe variabile metodologice care trebuie abordate. Stabilitatea circRNA și facilitatea detectării sunt influențate atât de calitatea ARN-ului, cât și de eficiența tratamentului cu ARNza R în eliminarea contaminanților liniari, precum ARN-uri mesagere intrudite care ar putea determina o amplificare fals-pozitivă. Ca atare, ipoteza noastră principală este că tratamentul cu ARNază R influențează în mod semnificativ pragul de detecție al circRNA din pool-ul total de ARN și că optimizarea acestuia este necesară pentru o detectare optimă.

Acest studiu propune un flux de lucru standardizat pentru validarea și explorarea circARN-urilor, utilizând ca model circARN validate anterior și pseudo-referite, și anume circFOXO3 și circPVT1, datorită nivelurilor de expresie detectabile și secvenței lor, care au fost studiate în contexte maligne.

După caracterizarea bioinformatică și validarea amorsoarelor proiectate în jurul punctului de fuziune, am continuat cu optimizarea pașilor de procesare a ARN-ului, cum ar fi concentrația inițială, intensitatea tratamentului cu ARN-azei și controlul calității ARN-ului au fost optimizate. După observațiile noastre, concentrația minimă recomandată e de cel puțin 1 ug de ARN total, pentru a compensa pierderile aferente tratamentului cu ARNza R și etapelor ulterioare de purificare. Condițiile optime de tratament cu ARNza R depind de stabilitatea și concentrația enzimei, concentrației de ARN, temperatură și alți factori. Analiza comparativă de a eficienței reacției arată importanța includerii probelor de control netratate pentru a evalua eficacitatea tratamentului cu ARNza R în îmbogățirea fracțiunii de circARN. Experimentele noastre au observat variații specifice ale probei și ale circRNA ale nivelurilor de amplificare, cu niveluri ridicate de circPVT1 post-tratament, indicând niveluri inițiale scăzute de detecție.

Pseudo-circRNA-urile neadnotate (circANAPC2 și circACAP2) au prezentat niveluri scăzute de detecție datorită nivelurilor lor scăzute de expresie, deși ambele au arătat rezistență semnificativă la digestia ARNază R în comparație cu omologii lor liniari. Transcrierea liniară ACAP2 a arătat chiar rezistență la ARNza R în mai multe cazuri, posibil datorită numărului său mare de elemente G-quadruplex (G4) din secvență. Am observat și faptul că concentrații mai mari de ARNază R afectează stabilitatea circARN-urilor și inhibă eliminarea eficientă a transcriptelor lineare,



subliniind necesitatea optimizării specifice transcriptului. Optimizarea etapei de digestie a ARN-azei R este crucială atunci când se investighează un anumit ARN-uri, deoarece funcția cheie a ARN-urilor este capacitatea lor de a elimina miARN-uri specifice, modificându-le efectele de reglementare asupra altor ARN-uri.

În continuare, am folosit totalitatea bazelor de date disponibile pentru a identifica miARN-uri relevante care ar putea interacționa și fi inactivate de circFOXO3, pentru a exemplifica o caracterizare funcțională a acestuia. Prin numărul de situsuri de interacțiuni, presupunem că MiARN-urile cu mai multe situsuri de legare în secvența circARN, cum ar fi miR-143-3p, au un potențial mai mare de interacțiune. Ca și detaliu, interacțiunea dintre miR-143-3p și circFOXO3 în cancerul gastric a fost observată în studii anterioare, subliniind importanța investigării interacțiunilor circRNA-miARN în diverse contexte patologice. Astfel, acest studiu se concentrează pe optimizarea metodelor ARNza R și RT-qPCR pentru transcrierile validate, în timp ce screening-ul potențial de noi circRNA pe baza sensibilității lor la tratamentele cu ARNază R. Optimizarea digestiei ARN-azei R este crucială, iar investigarea interacțiunilor circRNA-miARN în diferite contexte patologice este esențială pentru o mai bună înțelegere a rolului circRNA-urilor în procesele patologice.

---

PhD Thesis - Summary

# The roles of noncoding and circular RNAs in cancer

---

PhD Candidate **Rareş-Constantin Drula**

---

Thesis coordinator **Prof.Dr. Ioana Neagoie**

---

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Cancer</b>	19
1.1. Breast cancer	19
1.1.1. Therapeutic approaches in breast cancer	21
1.1.2. Estrogen signaling	22
1.1.3. Implications of estrogen signaling in breast cancer oncogenesis	22
1.2 Lung cancer	24
<b>2. Non-coding RNAs and circular RNAs</b>	27
2.1. miRNAs	27
2.1.1. Pathological involvement of miRNAs	28
2.1.2. miRNAs and estrogen signaling in breast cancer	29
2.1.3. Functional characteristics of miRNAs in cancer	30
2.2. lncRNAs	31
2.3. CircularRNAs	31
2.3.1. circRNA biogenesis	32
2.3.2. circRNA functions	33
2.3.3. circRNA detection and annotation methods	34
<b>3. miRNA-circRNA interplay in cancer</b>	37
3.1. circRNA-miRNA-target mRNA in breast and lung cancer	37
<b>4. Extracellular vesicles</b>	41
4.1. EV biogenesis	41
4.2. EV cargo composition and loading	42
4.3. miRNA loading into EVs and their biomarker potential.	43
4.4 Involvement of EV in oncogenic processes	45
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Hypothesis and objectives of the study</b>	49
<b>2. Methodology and design of the study</b>	51
<b>3. Study nr.1 – The role of Estrogen (17B-Estradiol) in the production of EV in ER+ breast cancer cells</b>	53
3.1. Introduction	53
3.2. Hypothesis	53
3.3. Materials and methods	53
3.4. Results	56
3.4.1 Evaluating the role of estrogen on EV production in ER+, TNBC and normal cell line models	56
3.4.2. Morphological aspects and nature of the cell media identified EVs.	59

---

3.4.3. Dependency of the observed mechanism on ER activity	62
3.4.4. Insights into the possible EV biogenesis model	62
3.5. Discussions	62
3.6. Conclusion	63
<b>4. Study nr.2 – The role of estrogen in modulating the cellular and extravesicular miRNOME and vesicle production in ER+ breast cancer models</b>	<b>65</b>
4.1. Introduction	65
4.2. Hypothesis	65
4.3. Materials and methods	66
4.4. Results	68
4.4.1. Evaluation of ER+ and TNBC cellular and EV-derived miRNA signatures using Microarray	68
4.4.2. qRT-PCR validation of selected differentially expressed cellular and EV miRNAs	72
4.4.3. Validation of miR-149-5p downregulation and bioinformatic investigation of ER-promoter interactions	73
4.4.4. Insights into the functional interaction between miR-149-5p and hnRNPA1 in regulating EV biogenesis and miRNA loading	74
4.5. Discussions	77
4.6. Conclusion	78
<b>5. Study nr.3 – Detection and validation of circRNAs using RT-qPCR in lung cancer models</b>	<b>79</b>
5.1. Introduction	79
5.2. Hypothesis	79
5.3. Materials and methods	80
5.4. Results	81
5.4.1. <i>In silico</i> circRNA construction, primer design and validation	81
5.4.2. RNase R treatment optimization and effect on circRNA detection	84
5.4.3. Optimized circRNA detection protocol using qRT-PCR	87
5.4.4. Bioinformatic circRNA-miRNA sponging prediction and construction of circRNA-miRNA-mRNA networks.	89
5.5. Discussions	91
5.6. Conclusion	92
<b>6. General discussions</b>	<b>93</b>
<b>7. Concluding remarks</b>	<b>95</b>
<b>8. Originality of the thesis and the contributions to the fields</b>	<b>97</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>99</b>

# INTRODUCTION

The establishment of molecular biology as a *bona-fide* science in its own right in the latter part of the 20th century paved the way for a deeper understanding of genetics and cellular processes. In addition, the ability to directly manipulate DNA and RNA, combined with rapid technological advances, have enabled the deciphering of the underlying molecular processes associated with pathologies. Oncology research, in particular, has seen multiple breakthroughs in identifying the genetic underpinnings of disease, risk factors, biomarkers of disease, and perhaps most importantly, effective therapies. As such, the molecular characterization of oncological processes has been the main line of research upon which the most important of these therapeutic discoveries have been based. However, although there have been major improvements in therapeutic approaches to most types of cancer, our understanding of this highly heterogeneous group of malignancies is still just beginning.

Breast and lung cancer are two of the most widespread and lethal forms, affecting millions of people worldwide. Despite progress in understanding the disease and the development of various treatment options, the prognosis for patients with advanced stages remains poor. Therefore, it is crucial that we continue to develop the molecular mechanisms underlying the development and progression of these cancers to improve our ability to develop new therapies. In line with this, the current molecular taxonomy of breast cancer has been established based on the expression of its hormone receptors and the transcriptional features they coordinate. Estrogen is the most important sex hormone and plays a crucial role in the development of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer, the most common subtype, accounting for more than 60% of BC cases. The characterization of the estrogen signaling pathway has been a cornerstone in the identification of therapies for this subtype of cancer, molecules such as tamoxifen being specifically defined as hormone inhibitors. However, despite the initial success of these therapies, many patients eventually develop resistance, highlighting the need for a better understanding of the molecular mechanisms underlying the interaction between estrogen and breast cancer cells. Although it is well known that estrogen is one of the main factors in the development of ER+ cancer, the full regulatory activity of this hormone has not yet been deciphered.

Extracellular vesicles (EVs) are small membrane-bound particles released by cells into the extracellular space, representing one of the main channels of intercellular communication. EV cargo contains a multitude of bioactive molecules, from DNA, various RNA species, and proteins, which can phenotypically alter the cells in which they are internalized. As such, EVs have been shown to play an important role in the communication between tumor cells and their microenvironment, facilitating the metastatic dissemination of their cells. Among the multiple components of EV molecular cargo, miRNAs (microRNAs), small RNA molecules that play a critical role in

---

gene regulation, have been highlighted given their extensive functional versatility and historical association with oncogenesis. So far, a connection between estrogen and EV-encapsulated miRNAs has not been outlined. Therefore, one of the first goals of this thesis is to contribute to the understanding of the role of estrogen in ER+ breast cancer by investigating the effect of estrogen on EV production, molecular signatures, and their miRNA loading mechanisms.

CircRNAs, on the other hand, are RNA molecules with a circular architecture resulting from the fusion of the ends of an immature RNA transcript following a process called back-splicing. Functionally, although they have limited coding potential, circRNAs have been shown to be important in the regulation of gene expression, acting as scaffolds for protein complexes and single-stranded decoys for miRNAs, potentially inactivating them. Thus, CircRNA research has advanced rapidly over the past few years, with an increasing number of studies suggesting a potential role for these RNA species in cancer biology. As this field of study is relatively young, many aspects related to the analysis and molecular characterization of circRNAs have not yet been well defined. This can make it difficult to compare results from different studies and draw conclusions about the role of circRNAs in cancer, resulting in inconsistencies and questioning their functional relevance. By binding to specific miRNAs, circRNAs can modulate the expression of target genes involved in tumorigenesis, angiogenesis, and therapy resistance. In addition, circRNAs have been shown to have specific expression patterns in lung cancer, suggesting their potential use as biomarkers for diagnosis and prognosis.

Therefore, we will focus on the bioinformatic and experimental aspects in the detection and characterization of a subset of circRNAs in lung cancer models, using all available online resources and experimental and quality control techniques to help define a methodological consensus. We will highlight how key processing steps, such as RNase R digestion of linear transcripts, can specifically enrich the fraction of circRNAs in total RNA, facilitating their detection. Thus, with this thesis we aim to contribute to the understanding of the role of non-coding RNAs, especially miRNAs, in cancer by carrying out three studies investigating the role of estrogen in modulating extracellular vesicle production and miRNA signatures, as well as establishing a protocol for circRNA detection in cancer cells. These studies will provide insights into the complex interplay between hormones, non-coding RNAs and cancer and may inform the development of new therapeutic strategies.

## Personal contribution

### **Study #1. Role of estrogen (17 $\beta$ -estradiol) in EV production in ER+ breast cancer cells**

The first component of this study aims to evaluate the role of estrogen in the production of extracellular vesicles (EVs) in positive, triple-negative breast tumor cells and in normal phenotype breast cells. To do this, we will culture these cell types in the presence and total absence of environmental estrogen. The supernatant will be collected and processed for EV purification using an appropriate method to produce accurate readings. Purified EVs will be counted using the Nanosight 3000, a widely used platform for characterizing nanoparticles in biofluids, and the results will be analyzed to determine the effect of estrogen on EV production in different cell types.

In line with our objective, our results showed that estrogen stimulation causes a significant increase in EV production in all ER-positive cell lines investigated, with no significant changes in ER-negative models. Morphological analysis of EVs identified using both Nanosight and TE microscopy confirmed the size distribution corresponding to exosomes, indicating an active release mechanism that may be subject to regulation. Dual inhibition of ER activity using tamoxifen, the most widely used ER antagonist, and ER siRNA knockdown confirmed the link between inhibition of ER signaling and EV biogenesis. This clearly suggests that the mechanism of EV production is different between molecular subtypes and that the estrogen pathway is specifically involved in the regulation of EV production. In addition, we indicated that nSMase2, an enzyme involved in ceramide metabolism and EV release, is involved in the observed mechanism, given the inhibitory effect of the inhibitory molecule GW4869 and its reversal after the addition of estrogen in a mechanism currently not deciphered.

From our observations, the link between estrogen and VE is a novel finding; as such, the full description of the mechanism involved could provide therapeutic opportunities given the broad implications of EV in the development of malignant phenotypes. Our results provide new insights into the relationship between hormone signaling and EV production in breast tumor cells and underscore the importance of understanding the various mechanisms by which hormones regulate EV production. Our findings could have significant implications for breast cancer diagnosis and treatment, as EVs have the potential to serve as diagnostic and therapeutic biomarkers. In addition, targeting the estrogen pathway in ER-positive breast tumor cells using tamoxifen or siRNA knockdown could provide a new therapeutic strategy for the treatment of breast cancer by reducing EV production, which could have an as yet unexplored impact on cancer cell spread and resistance .

---

## **Study #2. The role of estrogen in modulating the cellular and extravesicular miRNOME and vesicle production in ER+ breast cancer models**

In the previous study, we reported that estrogen modulates vesicle production in estrogen-positive breast tumor cells. In addition to its effects on cell proliferation and VE production, estrogen has been shown to regulate the expression of certain miRNAs. In this chapter, we will investigate the hypothesis that estrogen modulates the miRNA signature at the cellular level as well as VEs derived from tumor cell models.

In the course of this study, we highlighted a novel mechanism by which estrogen can regulate the miRNA cargo signature through a complex interaction network.

First, using microarray, we observed that the differential EV miRNA signature showed recurrent elements derived from the same miRNA family, namely let-7, which was the first indication of a common regulatory mechanism, and miR-149-5p at cellular level, observations subsequently validated using qRT-PCR. We confirmed using genomic bioinformatics data that ER, upon activation, may be responsible for the inhibition of miR-149-5p, given the presence of an ER-specific binding locus in the 5 kb upstream promoter region. Therefore, ER could bind this locus after activation, inhibiting the transcription of miR-149-5p. We were curious about the functional consequences of miR-149-5p regulation, by searching for a target mRNA with functional implications in either EV biogenesis or, ideally, miRNA loading in EV mechanisms. We identified hnRNPA1 RBP and SP1 transcription factors as potential targets of miR-149-5p. The first target, SP1 is a transcription factor involved in the transcription of several components of the EV biogenesis pathway, especially nsMASE2. This implies that inhibition of miR-149-5p may cause an increase in SP1 transcription, consequently causing upregulation of nsMASE2. nsMASE2 is a key factor in ceramide metabolism and EV biogenesis machinery. This, together with the identification of its connection with SP1 and indirectly with miR-149-5p, outlines a potential estrogen-dependent regulatory axis that modulates EV biogenesis in ER + BC cells.

On the other hand, the interaction between hnRNPA1 and miR-149-5p has been previously validated. Thus, we chose to validate hnRNPA1 as a potential factor involved in the loading of let-7 miRNA family members into EVs, given previous indications of proteins from the same family with similar activity. We observed an increase in hnRNPA1 levels following 17 $\beta$ -estradiol treatment in ER + cells, as previously indicated following ER-dependent regulation of miR-149-5p. Previous studies indicated that members of the hnRNP family bind target RNAs based on the presence of specific motifs in their sequence, which acted as the basis of our assumption that hnRNPA1 may directly interact with let-7. Thus, we confirmed the colocalization of hnRNPA1 with let-7 in VEs derived from BC cell lines using Western Blot. We identified the common binding sequence found in most let-7a family members. We validated the direct interaction between hnRNPA1 and let-7a and let-7d



using a direct protein-RNA biotin-streptavidin pulldown. As such, we confirmed the direct binding of let-7a and let-7d to hnRNPA1. This highlights an extensive estrogen-dependent interaction that could regulate the ejection of miRNAs widely regarded as tumor suppressors. The extended implications of let-7 in tumor suppression may form the basis of further study. Thus, this study highlights a novel estrogen-dependent mechanism that correlates the regulation of miR-149-5p expression with specific miRNA loading in EVs and possibly with VE biogenesis.

### **Study #3. Detection and validation of circRNAs using RT-qPCR in lung cancer models.**

Reliable and replicable protocols for the detection of circRNAs using RT-PCR are crucial for the accurate characterization of these transcripts. Given the complexity of circRNA protocols compared to standard RT-PCR, there are many methodological variables that need to be addressed. circRNA stability and ease of detection are influenced by both the quality of the RNA and the efficiency of RRNA treatment in removing linear contaminants such as intervening messenger RNAs that could cause false-positive amplification. As such, our primary hypothesis is that RNase R treatment significantly influences the detection threshold of circRNA from the total RNA pool and that its optimization is necessary for optimal detection.

This study proposes a standardized workflow for the validation and exploration of circRNAs, using previously validated and pseudo-referred circRNAs as a model, namely circFOXO3 and circPVT1, due to their detectable expression levels and sequence, which have been studied in malignant contexts.

After bioinformatic characterization and validation of primers designed around the fusion point, we proceeded with optimization of RNA processing steps such as initial concentration, RNase treatment intensity and RNA quality control were optimized. According to our observations, the recommended minimum concentration is at least 1 µg of total RNA, to compensate for the losses related to the R-RNA treatment and the subsequent purification steps. The optimal conditions for RNase R treatment depend on enzyme stability and concentration, RNA concentration, temperature, and other factors. Comparative analysis of reaction efficiency shows the importance of including untreated control samples to assess the effectiveness of RRNA treatment in enriching the circRNA fraction. Our experiments observed sample- and circRNA-specific variations in amplification levels, with high levels of circPVT1 post-treatment indicating low baseline levels of detection.

The unannotated pseudo-circRNAs (circANAPC2 and circACAP2) showed low levels of detection due to their low expression levels, although both showed significant resistance to RNase R digestion compared to their linear counterparts. The ACAP2 linear transcript even showed resistance to RNase R in several cases, possibly due to its high number of G-quadruplex (G4) elements in the sequence. We also observed that higher concentrations of RNase R affect the stability of circRNAs and inhibit the efficient elimination of linear transcripts, underscoring the need for transcript-specific

---

optimization. Optimizing the RNase R digestion step is crucial when investigating a particular RNA, as the key function of RNAs is their ability to knock out specific miRNAs, altering their regulatory effects on other RNAs .

Next, we used all available databases to identify relevant miRNAs that could interact with and be inactivated by circFOXO3, to exemplify a functional characterization of it. By the number of interaction sites, we assume that MiRNAs with more binding sites in the circRNA sequence, such as miR-143-3p, have a higher interaction potential. As a detail, the interaction between miR-143-3p and circFOXO3 in gastric cancer has been observed in previous studies, highlighting the importance of investigating circRNA-miRNA interactions in various pathological contexts. Thus, this study focuses on optimizing RNase R and RT-qPCR methods for validated transcripts, while screening potential new circRNAs based on their sensitivity to RNase R treatments. Optimizing RNase R digestion is crucial, and investigating of circRNA-miRNA interactions in different pathological contexts is essential for a better understanding of the role of circRNAs in pathological processes.