
Rezumat teză de doctorat

Evaluarea profilului molecular al endometriozei și malignităților asociate acesteia

Doctorand **Braicu Ovidiu-Leonard**

Conducător științific Prof.dr. **Irimie Alexandru**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

Abstract.....	3
Studiul 1: Evaluarea profilului molecular în endometrioză și cancerul ovarian ...	3
Studiul 3. Țintirea mecanismului de tranziție de la fenotipul epitelial la cel mezenchimal (EMT) în cancerul ovarian folosind compuși naturali	4
Studiul 3. Implicațiile terapeutice ale ARN de interferență în cancerul ginecologic	5
Rolul factorului de creștere tumorală $\beta 1$ siRNA în cancerul ovarian	6
Implicațiile p53 siARN în cancerul cervical.....	7
Concluzii generale.....	7
Bibliografie	15

Cuvinte cheie: endometrioză, cancer ovarian, miARN, ARN de interferență

Abstract

Endometrioza este o afecțiune ginecologică frecventă și sa demonstrat că în anumite situații a fi asociată cu transformarea malignă. În consecință, există o nevoie urgentă de a se dezvolta noi biomarkeri moleculari cu valoare de diagnostic și prognostic, atât în cazul endometriozei cat și pentru tumorile ginecologice, unde prognosticul rămâne în continuare sumbru, în pofida progresului înregistrat până în prezent.

Descoperirea ARN-urilor necodificatoare (ncARN), a condus la un interes crescut al acestor transcripti în ultimii ani in domeniul cercetariilor biomedicale, evidentiindu-se o gamă variată de aplicații practice, datorită capacității lor de a regla procese biologice cheie. După cum sugerează și numele acestora, ncARN-urile sunt secvențe care nu se traduc în proteine, dar au capacitatea de a regla mekansimul de expresie genică, cu un rol important în mecanismul de translație. În consecință, s-a demonstrat că aceste ncARN-uri un rol extrem de important în endometrioză și în mecanismele sale de transformare malignă, dar și în procesele de oncogeneză, invazie și metastazare a tumorilor solide, inclusiv în cazul cancerelor ginecologice.

Contribuția personală este prezentată în trei capitole, primul capitol se refera la evaluarea profilului molecular în endometrioza și malignitățile asociate acesteia. S-a urmărit identificarea profilului molecular specific endometriozei sau cancerului ovarian, dar și a profilului molecular care poate face diferența între endometrioza și cancerul ovarian, cu implicații în diagnostic și prognostic, în special pentru identificarea cazurilor de endometrioză cu risc crescut de malignizare. Următoarele două capitole se axează pe dezvoltarea de noi terapii țintite utilizând molecule mici (Caffeic Acid Phenethyl Ester) sau siARN care vizează oncogene cum ar fi p53, forma mutantă sau modulatori de răspuns imun (TGFβ1). Teza a fost axată pe descifrarea unor lacune cu privire la funcția miARN-urilor sau a siARN în procesele patologice din cadrul unor patologii ginecologice importante.

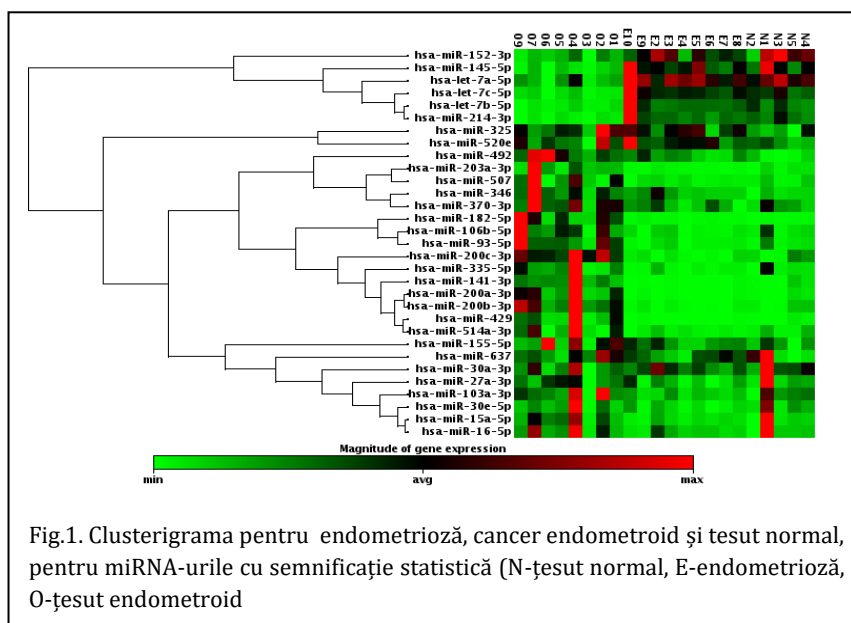
Rezultatele acestei teze au fost publicate în două articole cu factor de impact (Molecular and Cellular Biochemistry și OncoTargets and Terapy) și o lucrare B+ (Clujul Medical). De asemenea rezultatele au fost prezentate la conferințe naționale și internaționale.

Studiul 1: Evaluarea profilului molecular în endometrioză și cancerul ovarian

Endometrioza este o afecțiune ginecologică benignă care afectează femeile din perioada fertila, iar în anumite cazuri implanturi tisulare endometriale suferă o transformare malignă. In prezent există din ce în ce

mai multe dovezi care susțin acest proces de transformare malignă (1-3)

Cancerle ovariane sunt plasate în topul cancerelor la nivel mondial, pe baza celor mai recente date statistice, cu o rată crescută a mortalității datorată diagnosticului intarziat (3, 4). În consecință, este important să se identifice acele mecanisme moleculare responsabile pentru transformarea malignă (4) ținând seama de faptul că endometrioza este o patologie multifactorială corelată cu modificări ale nivelului de

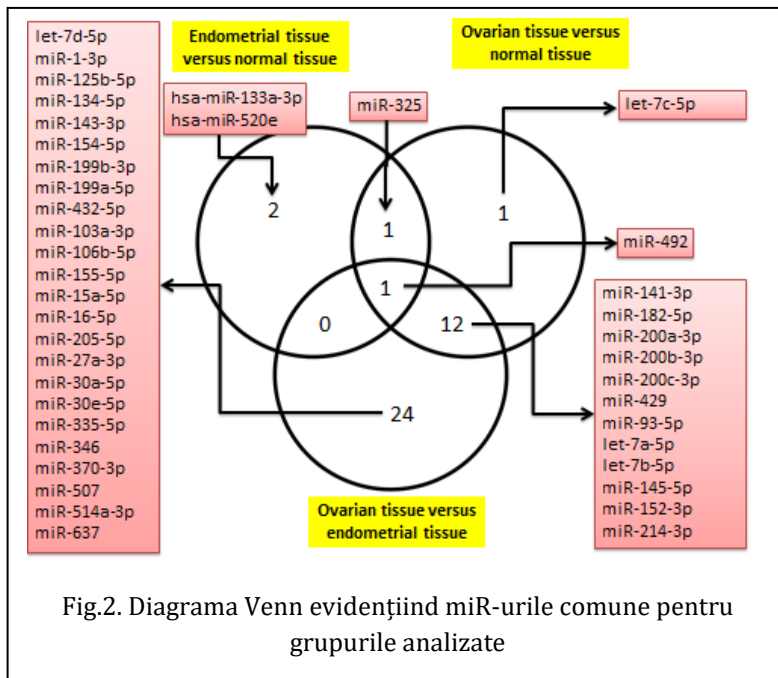


expresie ale unor gene sau ARN-uri necodificatoare (3,5).

Utilizarea probelor de țesut încorporat în blocuri de parafină (FFPE) este o sursă esențială de material biologic pentru analiza retrospectivă, pentru evaluarea profilurilor moleculare, incluzând miARN (miARN, secvențe scurte de ARN, cu lungime de 18-22 nucleotide), care pot fi utilizate pentru dezvoltarea unor biomarkeri cu aplicabilitate în medicina personalizată (3, 6).

În cazul cuantificării relative a nivelului de expresie pentru miARN în endometrioză versus țesut normal au fost obținute patru miARN-uri supraexprimate, în timp ce în cazul analizei pentru cancerul ovarian versus țesut normal au fost identificate cincisprezece miARN-uri cu un nivel de expresie modificat (șase subexprimate și nouă supraexprimate), considerând ca și valoare de referință un nivel de expresie de ± 1.5 și p-value < 0.05 , clusterigrama este prezentată în figura 1 și diagrama venn în fig. 2 (3).

Putem concluziona că endometrioza rămâne o boală intrigantă, dar fără îndoială miARN-urile joacă



un rol esențial în reglarea acelor procese moleculare implicate în transformarea malignă, acest lucru fiind susținut de prezenta miARN-urilor cu rol inflamator (miR-325) sau a transcripților care reglează mecanismul de tranziție de la fenotipul epitelial la cel mezenchimal (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-30a, miR-145 și miR-205). Profilul miARN identificat poate fi folosit pentru implementarea de noi scoruri cu valoare de prognostic, luând în considerare faptul că majoritatea miARN-urilor modificate identificate pot avea rol de prognostic pentru transformare malignă, în principal cele care reglează tranziția la fenotipul mezenchimal (3).

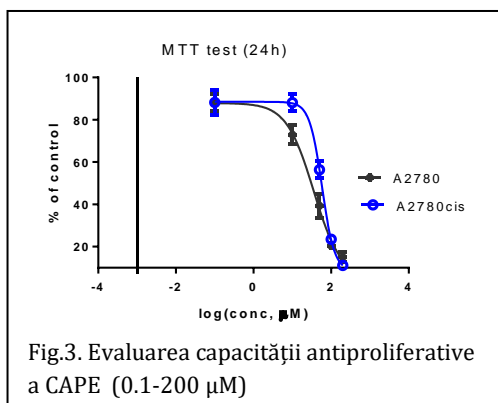
Studiul 2. Țintirea mecanismului de tranziție de la fenotipul epitelial la cel mezenchimal (EMT) în cancerul ovarian folosind compuși naturali

Nu există nici o îndoială că dintre cancerurile ginecologice, cancerul ovarian are rata de mortalitate cea mai ridicată, iar peste 90% din cazuri au o origine epitelială (7). Tratamentul cancerului ovarian include chirurgia ca și primă linie de tratament urmat de chimioterapie, dar aceste două variante de cele mai multe

ori nu oferă rezultatul dorit (7). Principala problemă în cazul cancerului ovarian este reprezentată de activarea mecanismelor de chemorezistență (8).

Chemorezistența este un obstacol major în oncologia medicală, inclusiv în cazul tratamentului cancerului ovarian (9). Cisplatinul, un agent terapeutic pe bază de platină, este în prezent utilizat pe scară largă într-o gamă largă de tumori solide, inclusiv în cazul cancerului ovarian. Totuși, rezistența la cisplatină este adesea regăsită în mod frecvent în practica clinică (8, 11, 12).

Există un interes sporit pentru a combate mecanismul de rezistență, prin dezvoltarea unor alternative terapeutice



folosind diferite tipuri de molecule mici naturale sau sintetice pentru această patologie devastatoare (13-15).

În studiul nostru am selectat un agent terapeutic natural din clasa polifenolilor, feniletul esterul acidului cafeic (CAPE), care a fost demonstrat a avea capacitatea de a modula multiple căi moleculare, având un efect semnificativ antitumoral (13-15). În acest sens efectele biologice active ale CAPE au fost evaluate pe două linii celulare de cancer ovarian A2780 și A2780cis (linia celulară rezistentă la cisplatină).

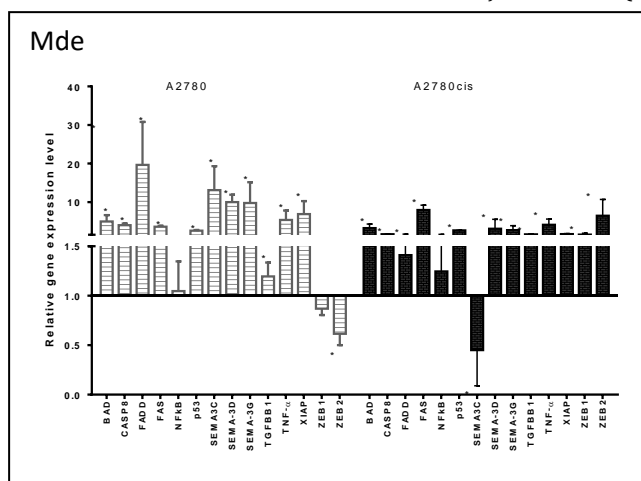


Fig. 4. Modelul de expresie genică după tratamentul cu 10μM CAPE în liniile celulare A2780 și A2780cis

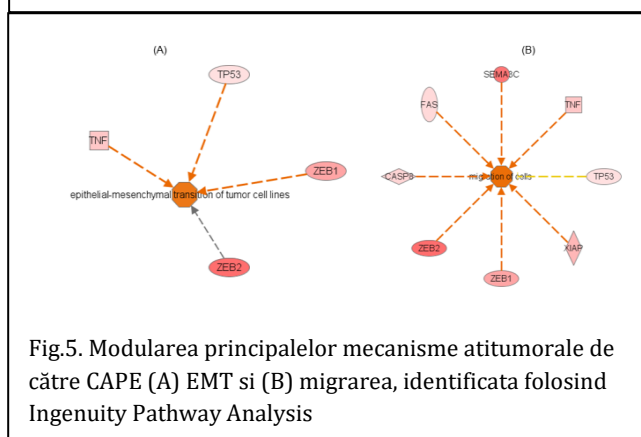


Fig.5. Modularea principalelor mecanisme antitumorale de către CAPE (A) EMT și (B) migrarea, identificată folosind Ingenuity Pathway Analysis

Tratamentul CAPE a evidențiat a avea un efect antiproliferativ semnificativ, efectul fiind mai pronunțat în cazul celulelor A2780 decât în cazul celulelor A2780cis (Fig.3). În cazul tratamentului cu o doză de 10 μM CAPE, a fost observată activarea mecanismelor de apoptoză (8).

Evaluarea profilului de expresie genică a fost realizat pentru un set de gene relevante pentru mecanismul de apoptoză și angiogeneză, datele fiind prezentate în Fig.4.

A fost evaluat nivelul de expresie proteică pentru p53 prin tehnica imunohistochimie, astfel a fost identificat un nivel redus în cazul celulelor A2780, în timp ce în cazul celulelor rezistente la cisplatină nu a fost observat nici un efect pentru tratamentul cu CAPE. S-a evaluat și cantitatea de TGFβ1 eliberat în mediul de cultură prin tehnica ELISA, observându-se un nivel de exprimare redus în cazul tratamentului cu CAPE (8).

Studiul nostru arată că EMT este un element cheie în modularea căilor de rezistență la medicamente (TGFβ1, ZEB1 și ZEB2), după cum este demonstrat și în Fig.5

În concluzie putem spune că CAPE este un candidat important în dezvoltarea de noi strategii terapeutice țintite, administrat singur

sau în diferite combinații cu compuși chemoterapeutici clasici; dar aceste investigații trebuie să fie continuate și validate pe model animal (8).

Studiul 3. Implicațiile terapeutice ale ARN de interferență în cancerul ginecologic

În ultimii ani, interesul pentru mecanismul de interferență ARN (ARNi) a crescut semnificativ. Acest mecanism natural este un instrument util care permite inhibarea în mod specific a unor ținte moleculare precise, care au ca și efect restaurarea fenotipului normal celular (16).

În celulele eucariote, ARNi este capabil să moduleze nivelul de exprimare a genelor prin intermediul unor ARN-uri de interferență mici (siARN), acestea fiind transcripți dublu catenari (21-25 nucleotide lungime). siARN-ul este asociat cu un complex enzimatic, denumit RNA-induced silencing complex (RISC), care se leagă de ARNm (ARN mesager), producând activarea căilor endonucleazice, care au capacitatea de a suprima procesul de translație (16-17).

Utilitatea acestui mecanism poate fi demonstrată prin numărul crescut de studii clinice. ARNi au capacitatea de a depăși multe dintre dificultățile întâlnite în cazul terapiei clasice (17).

Rolul factorului de creștere tumorală $\beta 1$ siARN în cancerul ovarian

Celulele tumorale ovariene sunt recunoscute ca având alterate mecanismele de semnalizare reglate de către factorul de creștere tumorală (TGF β 1)(18). Studiile recente au arătat că această citokină joacă un rol

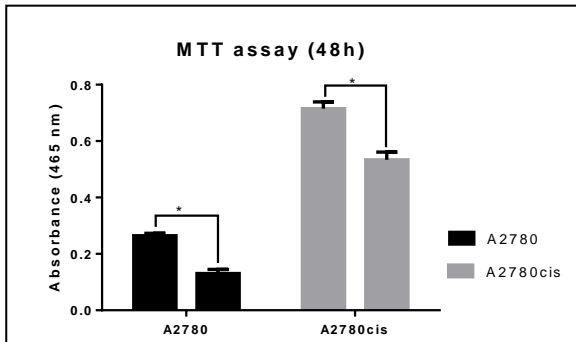


Fig.6. Evaluarea efectului antiproliferativ indus de TGF β siARN

dublu în reglarea creșterii tumorale. În celulele normale și în procesele carcinogenice timpurii, această citokină acționează ca supresor tumoral; iar în cazul proceselor carcinogenice avansate susțin creșterea tumorală și metastaza la distanță (20).

Majoritatea tumorilor ovariene au manifestat o activitate crescută a căii de semnalizare reglată de TGF β 1 (20). Pentru a evalua rolul complex al acestei citokine, am utilizat tehnica de ARNi pentru a inhiba în mod specific nivelul de expresie pentru această citokină și posibilele implicații în rezistența la terapie.

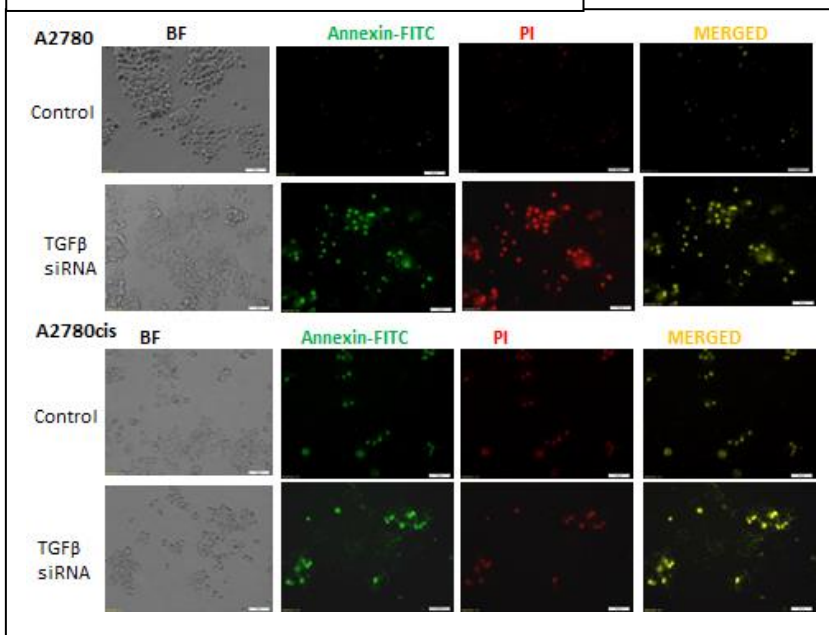


Fig.7. Evaluarea mecanismelor apoptotice ca răspuns la 48 de ore posttratament cu TGF β 1 siARN

Efectul TGF β 1 siARN asupra proliferării celulare a fost evaluat utilizând testul MTT. După cum se poate observa din valorile absorbantei la 459 nm, putem spune că celulele rezistente la cisplatină (A2780cis) au o rată de proliferare mult mai mare decât A2780. La 48 de ore după transfectia cu siARN, se observa o reducere semnificativă a proliferării celulare (Fig.6).

Efectul TGF β 1 siARN asupra activării apoptozei a fost evaluat prin marcarea cu anexină-FITC/PI pe cele două linii celulare, efectul fiind evaluat folosind microscopia de fluorescență la 24 de ore nu s-a găsit nici o

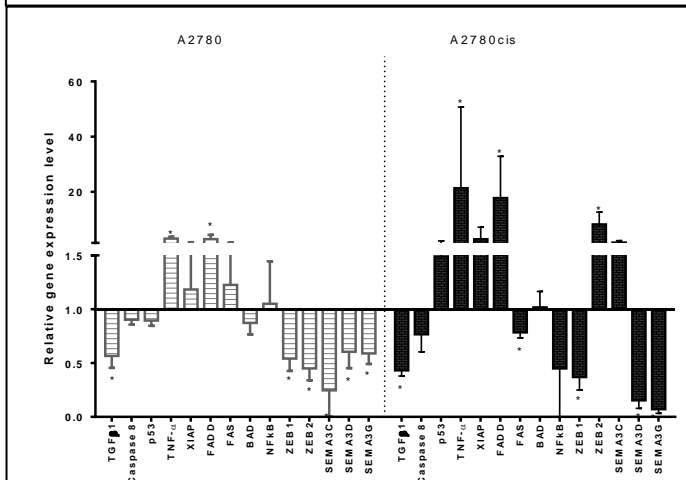


Fig.8. Evaluarea nivelului de expresie genică ca raspuns la transfectia cu TGF β 1 siARN pe liniile celulare A2780 și A2780

modificare semnificativă, în timp ce la 48 de ore am observat o rată apoptotică crescută, efectul fiind mai mult pronunțat în cazul celulelor sensibile la cisplatină, aceste date fiind în concordanță cu cele observate în cazul testului de proliferare celulară (Fig.7).

A fost evaluat efectul tratamentului TGF β 1 siARN la nivel de mRNA folosind tehnica de qRT-PCR, fiind selectate un panel de gene implicate în apoptoză, EMT și angieneză, rezultatele fiind prezentate în Fig.8.

Studiul nostru arată că inhibarea TGF β 1 folosind siARN este interconectată cu receptorii morții celulare, care conduc la activarea mecanismelor de apoptoză. Datele

noastre arată că TGFβ1 are un rol important în susținerea comportamentului invaziv al celulelor cancerigene ovariene prin reglarea semaphorinelor și nu numai, prin reglarea țintelor directe: Zeb1 și Zeb2. Răspunsul este diferit în cele două linii celulare selectate, în cazurile de rezistență la terapie, Sema3C și Zeb2 sunt activate. Studiul nostru oferă noi perspective asupra mecanismelor de rezistență la terapie.

Implicatiile p53 siARN în cancerul cervical

Cancerul de col uterin este o patologie ginecologică cu o prevalență ridicată în România, unde infecția HPV (human papilloma virus) joacă un rol important în tranziția de la epiteliul normal la neoplazia cervicală

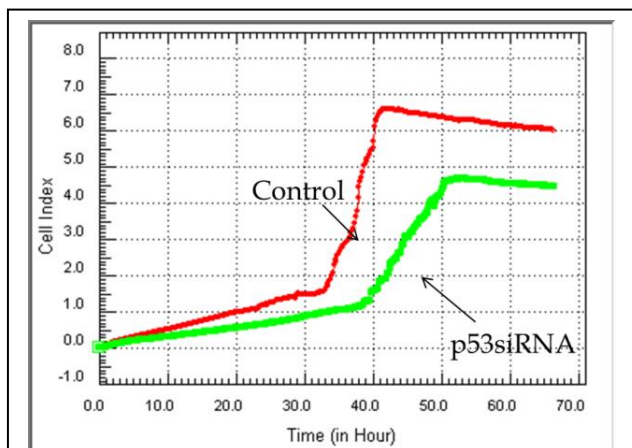


Fig.9 Monitorizarea in timp real a invaziei celulelor HeLa

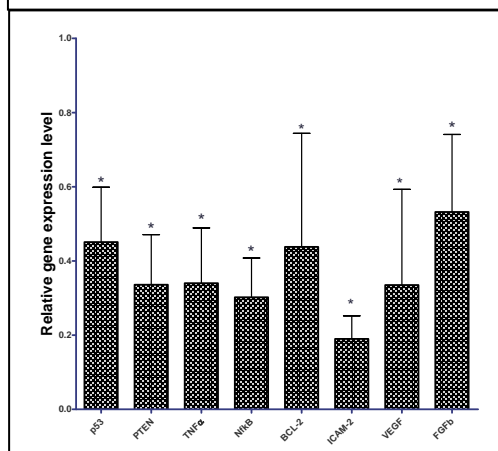


Fig.10 Modelul de expresie genica la 24 ore dupa transfectia cu p53siARN

(21). Cascada cancerigenă este în general legată doar de infecția cu HPV sau în tandem cu alți agenți toxici de mediu, care conduc la o serie de modificări la nivel molecular, la nivelul unor oncogene sau gene supresoare tumorale care activează mecanismele tumorale și susțin progresia tumorală (21).

siARN reprezintă un instrument terapeutic inovator pentru studierea rolului unor gene ca și ținte terapeutice pentru a inhiba în mod specific oncogenele (22).

Mecanismul de reglare a p53 este foarte complex, pentru majoritatea patologiilor tumorale p53 are un rol supresor tumoral, dar odată ce mutația s-a produs p53 are un rol oncogenic (23).

În literatură gena p53 este prezentată în mod metaforic ca și "good cop or the bad cop", de aceea am decis să evaluăm rolul acestei gene în cancerul cervical folosind siARN (21).

Folosind sistemul xCELLigence am putut să demonstrăm ca siARN a indus o intarziere și o reducere a procesului de invazie și migrare celulară în cazul p53 siARN (Fig.9).

Quantificarea nivelului de expresie genică ca răspuns la tratament cu p53 siARN a fost realizată folosind tehnica de qRT-PCR pentru un panel de 8 gene relevante implicate în apoptoză și angiogeneză. Toate genele selectate au avut un nivel de expresie redus în cazul transfecției cu p53 siARN (21).

În studiul nostru am reusit să demonstrăm că inhibarea cu p53 siARN țintește nu doar mecanismele de apoptoză, dar și cele de angiogeneză sau invazie.

Concluzii generale

Rezultatele cele mai importante ale acestei teze se referă la rolul important a miARN în endometrioză și patologii asociate acesteia, a condus la identificarea unor miARN cu valoare de prognostic sau diagnostic. Partea a doua se referă la testarea unor noi strategii terapeutice în cancerul ovarian, folosind molecule mici sau siARN care vizează oncogene cum ar fi p53 sau modulatori de răspuns imun, conducând la un răspuns terapeutic crescut.

PhD Thesis Summary

Molecular profiling of endometriosis and related malignancies

PhD student **Braicu Ovidiu-Leonard**

Scientific supervisor Prof.dr. **Irimie Alexandru**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HATIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

Abstract	10
Study 1: miRNA expression profiling in endometriosis and endometrioid cancer	10
Study 2. Targeting epithelial to mesenchymal transition (EMT) in ovarian cancer using natural compounds 11	
Study 3. Therapeutic implication of RNA interference in gynecological cancers.	12
Implication of transforming growth factor β siRNA in ovarian cancer	12
Implication of p53 siRNA therapy in cervical cancer	13
General Conclusions	14
References	15

Key words: endometriosis, ovarian cancer, miRNA, RNA interference

Abstract

Endometriosis is a common gynaecological condition which was found for some cases to be linked with a raised risk for malignant transformation. Consequently, there is an urgent challenging for developing novel molecular biomarkers for diagnostic and prognostic, in particular for the gynaecological cancers where the prognostic still remain unfavourable in spite of the progress registered until now.

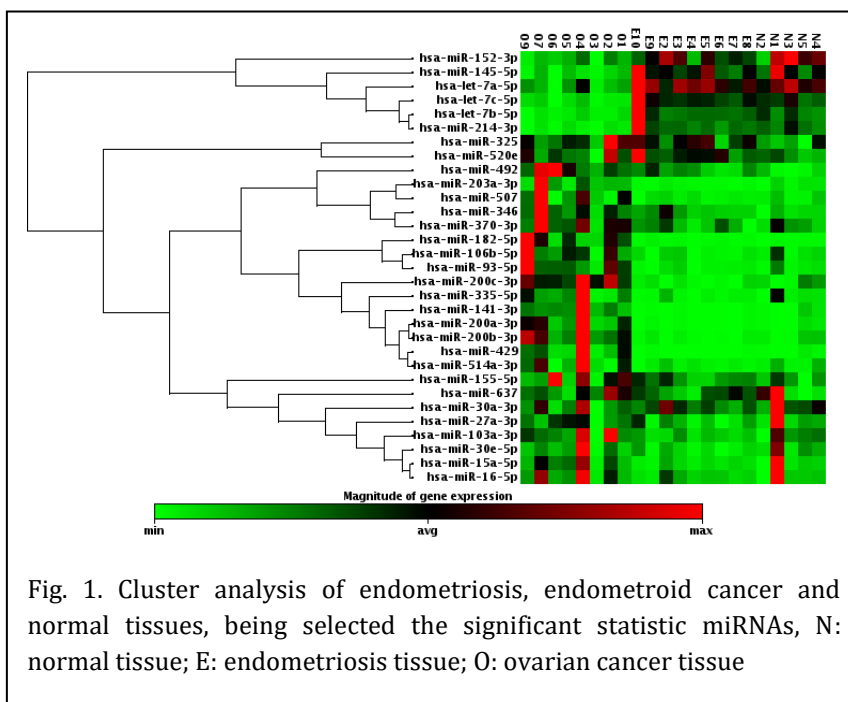
The discovery of non-coding RNAs (ncRNAs) was connected with an increased interest for these transcripts during the last years, due to their capacity to regulate key biological processes. As their name suggests, ncRNAs are sequences that do not translate into the target protein, but have the capacity to regulate gene expression mechanism, with important role in translation mechanism. ncRNAs were proved to have a consequential role in endometriosis and its transformation and carcinogenesis-related mechanisms, invasion and metastasis of solid tumours, including the gynaecological cancers.

The personal contribution is presented in three chapters, first one is a study focused on the evaluation of miRNA profiling in endometriosis and its related malignant diseases. This was focused on the identification of the most relevant altered transcripts, to detect the endometriosis miRNA portrait involved in endometriosis and ovarian carcinogenesis and to use the identified altered pattern as molecular diagnostic and prognostic markers, especially for identification of endometriosis cases that have a high risk to become malignant. The next two chapters are focused on developing new targeted therapies using small molecules (Caffeic Acid Phenethyl Ester) or siRNA targeting oncogenes such as p53, or immune response modulators (TGF β 1). The thesis was centred on the replenishing of some gaps concerning the function of miRNA and siRNA in pathological status of some gynaecological diseases.

The results of this thesis were published in two articles with impact factor (Molecular and Cellular Biochemistry and OncoTargets and Therapy) and one B+ paper (Clujul Medical). Also result data were presented at national and international conferences.

Study 1: MiRNA expression profiling in endometriosis and ovarian cancer

Endometriosis is a benign gynaecological condition that affects premenopausal women and in some particular cases, these implants undergo malignant transformation. There is now more and more evidence

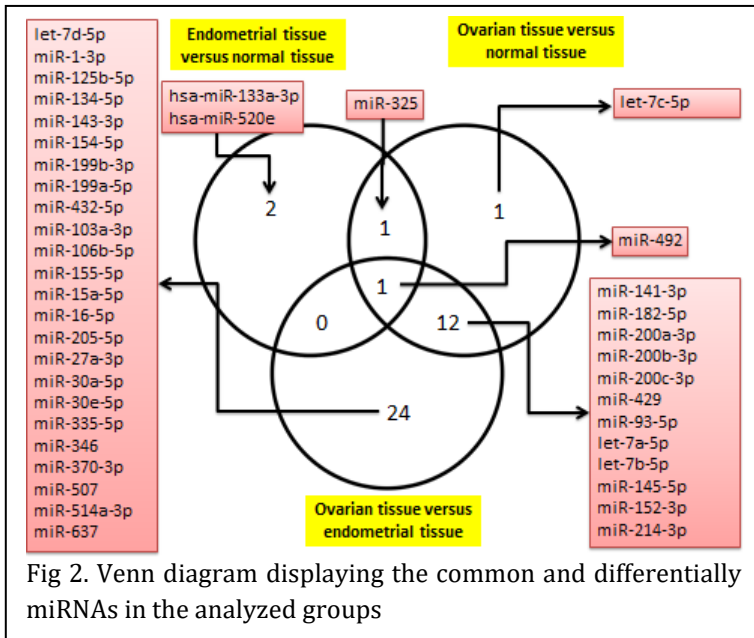


supporting this malignant transformation process (1-3).

Ovarian cancer is placed in the top of cancer worldwide, based to the latest statistic data, with an increased mortality rate due to the late diagnostic (3, 4). Accordingly, it is consequential to discern those molecular mechanism responsible for the malignant transformation, (4) taking into account that endometriosis is a multifactorial pathology, controlled by coding and non-coding transcripts (3, 5).

Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue is a key source of biological material for retrospective analysis, for evaluation of molecular profiling, including miRNA (miRNA, 18-22 nucleotide length transcripts), and for developing novel biomarkers for personalized health care (3, 6).

In the case of analysis for the expression level for miRNAs in endometriosis tissue versus normal tissue we revealed four miRNAs to be overexpressed, meanwhile in the case of analysis for ovarian cancer versus normal tissue we revealed fifteen miRNAs with an altered expression level (nine over-expressed and six down-regulated), considering as cut-of value 1.5-fold expression difference and p-value of <0.05, the clustergram being presented in Fig. 1 and the Venny diagram in figure 2(3).



We can conclude that endometriosis still remains a mysterious disease but is undoubtedly that miRNAs show an imperative function in the regulation of those processes related to the malignant transition, being sustained by the inflammatory miRNAs (miR-325) and those connected to epithelial to mesenchymal transition (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-30a, miR-145 and miR-205). The identified miRNAs profile can be used for implementation of novel prognostic scores, taking in account that most of the altered miRNAs can envisage malignant transformation, predominantly for assessment of those miRNAs that regulate mesenchymal transition (3).

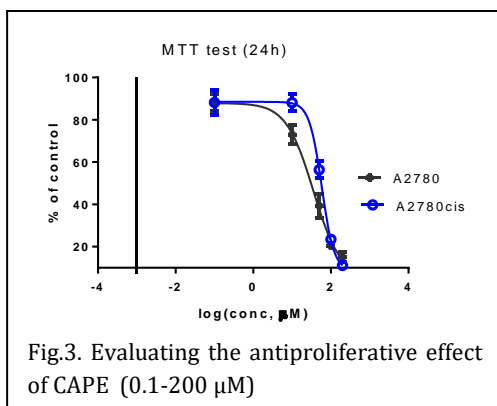
Study 2. Targeting epithelial to mesenchymal transition (EMT) in ovarian cancer using natural compounds

There is no doubt that the most lethal gynaecological cancer is represented by the ovarian cancer, and over 90% are with epithelial origin (7). Treatment of ovarian cancers includes surgery and chemotherapy, but these possibilities are not often operative because of relapse in patients (7). The main problem retrieved in the case of ovarian cancer is represented by the activation of the chemoresistance related mechanisms (8).

Chemoresistance is a major obstacle for the effective treatment of ovarian cancers (9). Cisplatin, a

platinum-based therapeutic agent, is presently widely used in a wide range of solid tumours, including the case of ovarian cancer; still, resistance to cisplatin is very often retrieved in clinical practice(10). There is an increased interest in order to combat the resistance mechanism, by developing therapeutic alternative using small natural or synthetic molecules for this devastating pathology (8, 11, 12).

In our study we selected a natural agent from polyphenols class, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), the major bioactive flavonoid in honeybee propolis extract having the capacity to modulate a wide range of molecular pathways with a significant effect in antitumoral therapy (13-15). In



this context, the biologically active effects of CAPE were evaluated on two A2780 and A2780cis ovarian cancer cell lines (cisplatin-resistant cell line).

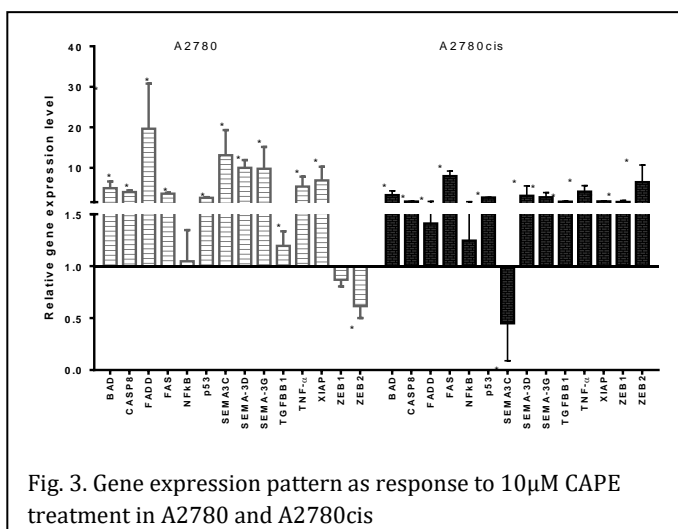


Fig. 3. Gene expression pattern as response to 10µM CAPE treatment in A2780 and A2780cis

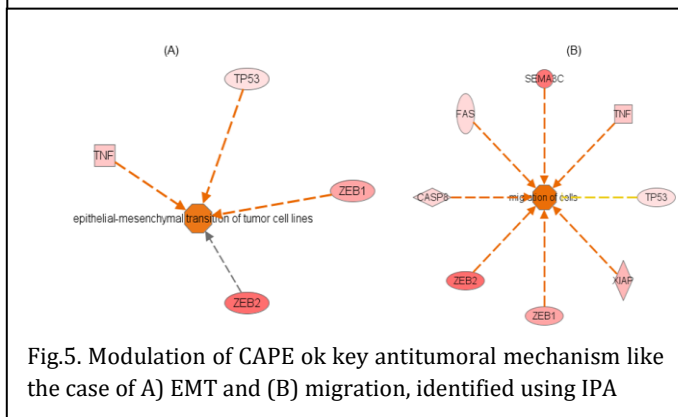


Fig.5. Modulation of CAPE on key antitumoral mechanism like the case of A) EMT and (B) migration, identified using IPA

The treatment of CAPE revealed a significant antiproliferative effect, the effect being more pronounced for the case of A2780 cells than in A2780cis cells (Fig.3). The treatment with 10 µM CAPE reveals a significant proapoptotic effect, in both cell lines (8).

In order to assess the mechanism of action for this important bioactive compound, we selected a panel of some relevant apoptotic and angiogenic genes, these being summarized in fig. 5. It was evaluated the p53 expression level by immunohistochemistry, revealing a reduced expression level in the case of A2780 cells, meanwhile for the case of cells resistant to cisplatin no effect for CAPE treatment was found. The TGFB1 release from cell culture supernatant was evaluated using ELISA, observing a reduced expression level in the case of CAPE treatment (8).

Our study reveals EMT as a key element in the modulation of drug resistance pathways (TGFB1, ZEB1 and ZEB2). We suggest that CAPE is a sustainable nominee in the process of the developing targeting therapies alone or in combination with classical therapy; the continuing exploration

must additionally describe the complex mechanism of CAPE effects on animal models (8).

Study 3. Therapeutic implication of RNA interference in gynecological cancers.

In the last years, the interest for RNA interference (RNAi) mechanism has significantly increased. This natural mechanism is a useful tools that facilitate specifically inhibition of a single or multiple molecular targets in order to restore the normal phenotype of the cell (16).

In eukaryotic cells RNAi is able to modulate the gene expression level via small interference RNAs (siRNA); these are short double stranded transcripts (21-25 nucleotides long). siRNA is linked with an enzymatic complex, named RNA-induced silencing complex (RISC), which targets and cuts the complementary mRNAs (messenger RNA) by the activation of the endonucleolytic pathway, that has the capacity to suppress the translation process(16, 17).

The utility of this mechanism is demonstrated by the increased numbers of clinical trials. RNAi have the capacity to overcome many of the difficulties produced by classical therapy (17).

Implication of transforming growth factor β siRNA in ovarian cancer

Ovarian cancer cells are well recognized to be linked with the deprived responsiveness to repressing growth signals struggled by transforming growth factor β (TGFβ). Recent studies revealed that this cytokine have a dual role on the regulation of tumour growth (18). In normal cells and early carcinogenic stages, this cytokine acts as tumour suppressor; meanwhile in the case of advanced carcinogenic stages the cytokine sustains tumour growth and distant metastasis (19).

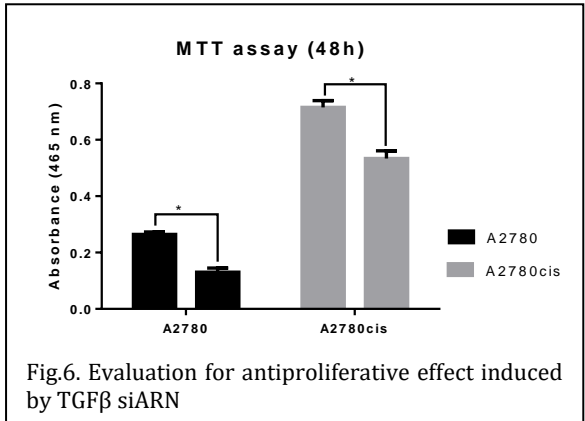


Fig.6. Evaluation for antiproliferative effect induced by TGFβ siARN

Most of the ovarian tumours manifest elevated activity of the TGF-β signalling pathway (20). In order to assess the complex role of this cytokine we used ARNi in order to specifically inhibit the expression level for this complex cytokine and its possible implication in resistance to therapy.

The effect of TGFβ siRNA on cell proliferation was assessed using MTT test. As this can be observed from the values of the absorbance at 459 nm, that is a parameter directly proportional with the number of the cells, we can say that cisplatin resistant cells have a much higher cell proliferation rate than non-resistant

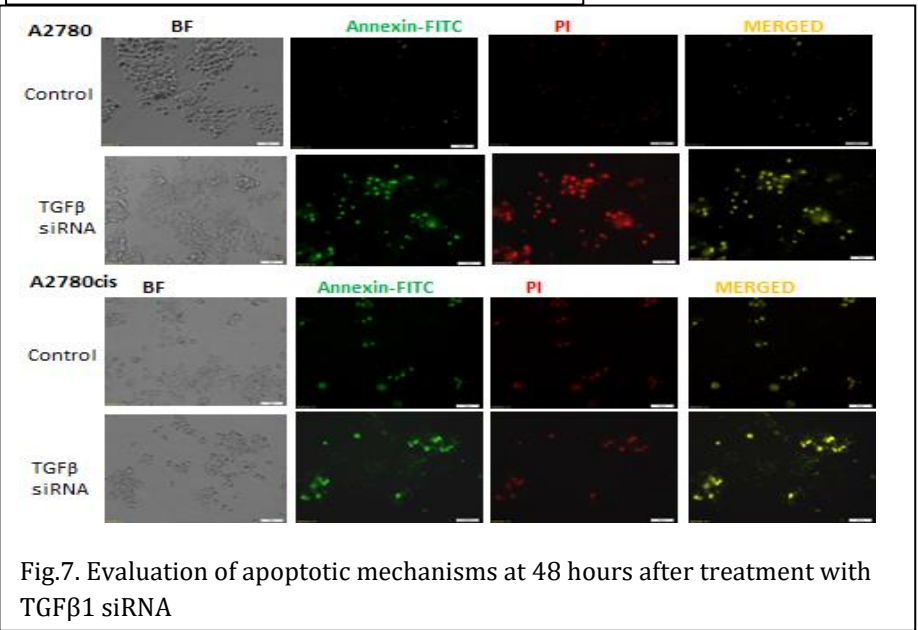


Fig.7. Evaluation of apoptotic mechanisms at 48 hours after treatment with TGFβ1 siRNA

cell line. At 48 hours post transfection we have a statistically significant reduction of cell proliferation rate caused by TGFβ1 siRNA (Fig.6). The effect of TGFβ1 siRNA was assessed using Annexin-FITC/PI staining on the selected cell lines, therefore at 24 hours no significant alteration was found, meanwhile at 48 hours we observed an increased apoptotic rate, the effect being more pronounced in the case of

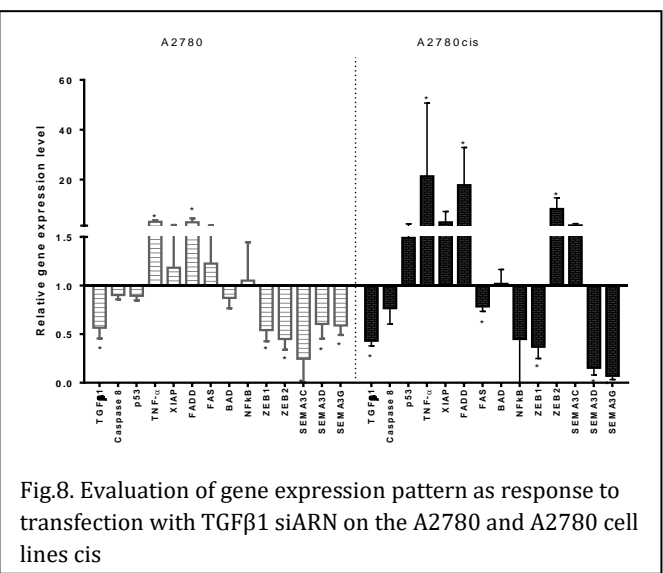


Fig.8. Evaluation of gene expression pattern as response to transfection with TGFβ1 siARN on the A2780 and A2780 cell lines cis

cisplatin sensitive cells, this data being in agreement with those observed for the case of cell proliferation test (Fig.7).

The effect of TGFβ1 siRNA at mRNA level was evaluated using qRT-PCR method, for a panel of genes involved in apoptosis, EMT and angiogenesis related mechanism, the results being shown in Fig.8.

Our study reveals that the inhibition of TGFβ1 using siRNA is interconnected with death receptors pathways that promote apoptosis pathway. Our data reveals that TGFβ1 have an important role in sustaining the invasive behavior for ovarian cancer cells by targeting also semaphorins and not only the direct targets: Zeb1 and Zeb2. The response

being different in the two selected cell lines, in the cases of resistance to therapy, Sema3C and Zeb2 are activated. Our study provides novel mechanistic insights into the resistance to therapy mechanisms.

Implication of p53 siRNA therapy in cervical cancer

Cervical cancer is a prevalent gynaecological pathology in Romania, being a multistage process where the HPV (human papilloma virus) infection plays an important role in the transition from normal epithelium to cervical neoplasia (21). The carcinogenic cascade is generally only linked to HPV infection or in tandem with other toxic environmental agents that lead to a number of molecular alterations in oncogenes or suppressor genes that activate early carcinogenic mechanisms and promote tumour progression (21).

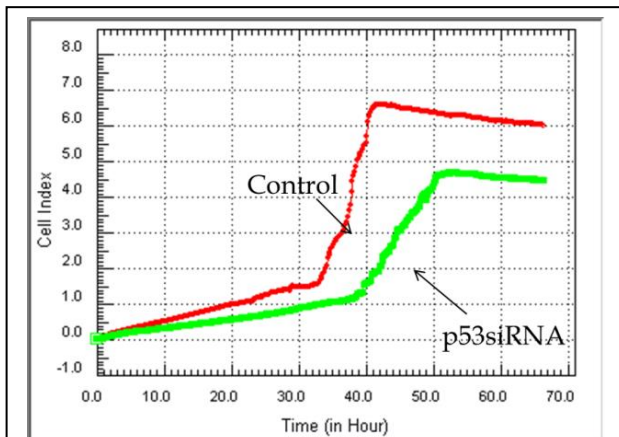


Fig.9 Real-time monitoring of HeLa cells invasion



Fig.10 Gene expression pattern at 24h after transfection with p53siRNA

siRNAs represent an innovative tool for studying the role of a key gene or as a therapeutic target to inhibit the oncogenic proteins overexpressed in tumoral pathology (22).

The mechanism of p53 regulation is very complex, for most of tumoral pathologies having a tumour suppressor role, but once mutated gains an oncogenic role(23). In literature p53 is presented as "good cop or the bad cop" (24), therefore we

decided to investigate the role of this gene in cervical cancer using siRNA (21). By using the xCELLigence System we were able to demonstrate that we have a delay and a decrease of the cell invasion and migration capacity in the case of p53 siRNA treatment (Fig.9).

The quantification effect on gene expression as a response to p53 siRNA was done using a qRT-PCR based protocol (Fig. 22). A panel of 8 relevant genes was selected that regulate apoptosis and angiogenesis mechanisms. All the selected genes evaluated were found to be downregulated as response to p53 siRNA treatment (21).

General Conclusions

The most important results of this thesis refer to the important role of miRNA in endometriosis and its associated associations, leading to the identification of relevant miRNAs with implication in prognostic and diagnostic. The second part was focused on testing a new therapeutic strategy in ovary cancer using small molecules or siRNA targeting oncogenes such as p53 or immune response modulators, leading to an increased therapeutic response.

References

1. Kondi-Pafiti A, Papakonstantinou E, Iavazzo C, Grigoriadis C, Salakos N, Gregoriou O. Clinicopathological characteristics of ovarian carcinomas associated with endometriosis. Archives of gynecology and obstetrics. 2012;285(2):479-83.
2. Suryawanshi S, Vlad AM, Lin H-M, Mantia-Smaldone G, Laskey R, Lee M, et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(5):1213-24.
3. Braicu OL BL, Buiga R, Jurj A, Achimas-Cadariu P, Pop LA, Braicu C, Irimie A, Berindan-Neagoe I. miRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded endometriosis and ovarian cancer samples. OncoTargets and Therapy Volume 2017;10:4225-38.
4. Guo SW. Endometriosis and ovarian cancer: potential benefits and harms of screening and risk-reducing surgery. Fertility and sterility. 2015;104(4):813-30.

5. Laudanski P, Charkiewicz R, Tolwinska A, Szamatowicz J, Charkiewicz A, Niklinski J. Profiling of Selected MicroRNAs in Proliferative Eutopic Endometrium of Women with Ovarian Endometriosis. *BioMed research international*. 2015;2015:760698.
6. Chen X, Lu P, Wang DD, Yang SJ, Wu Y, Shen HY, et al. The role of miRNAs in drug resistance and prognosis of breast cancer formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Gene*. 2016;595(2):221-6.
7. Shin SY, Jung H, Ahn S, Hwang D, Yoon H, Hyun J, et al. Polyphenols bearing cinnamaldehyde scaffold showing cell growth inhibitory effects on the cisplatin-resistant A2780/Cis ovarian cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2014;22(6):1809-20.
8. Gherman C, Braicu OL, Zanoaga O, Jurj A, Pileczki V, Maralani M, et al. Caffeic acid phenethyl ester activates pro-apoptotic and epithelial-mesenchymal transition-related genes in ovarian cancer cells A2780 and A2780cis. *Molecular and cellular biochemistry*. 2016;413(1-2):189-98.
9. Solar P, Sytkowski AJ. Differentially expressed genes associated with cisplatin resistance in human ovarian adenocarcinoma cell line A2780. *Cancer letters*. 2011;309(1):11-8.
10. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2010;62(1):45-52.
11. Andrews PA. Mechanisms of acquired resistance to cisplatin. *Cancer treatment and research*. 1994;73:217-48.
12. Gosland M, Lum B, Schimmelpfennig J, Baker J, Doukas M. Insights into mechanisms of cisplatin resistance and potential for its clinical reversal. *Pharmacotherapy*. 1996;16(1):16-39.
13. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 2014;19(12):19610-32.
14. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002;73 Suppl 1:S21-9.
15. Akyol S, Isik B, Altuntas A, Erden G, Cakmak O, Kursunlu SF, et al. Future opportunities in preventing ototoxicity: Caffeic acid phenethyl ester may be a candidate (Review). *Molecular medicine reports*. 2015;12(3):3231-5.
16. Jung HS, Rajasekaran N, Ju W, Shin YK. Human Papillomavirus: Current and Future RNAi Therapeutic Strategies for Cervical Cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2015;4(5):1126-55.
17. Peralta-Zaragoza O, Bermudez-Morales VH, Madrid-Marina V. [RNA interference: biogenesis molecular mechanisms and its applications in cervical cancer]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2010;62(1):63-80.
18. Gulei D, Mehterov N, Ling H, Stanta G, Braicu C, Berindan-Neagoe I. The "good-cop bad-cop" TGF-beta role in breast cancer modulated by non-coding RNAs. *Biochimica et biophysica acta*. 2017;1861(7):1661-75.
19. Lebrun J-J. The Dual Role of TGF in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*. 2012;2012:28.
20. Basu M, Bhattacharya R, Ray U, Mukhopadhyay S, Chatterjee U, Roy SS. Invasion of ovarian cancer cells is induced by PITX2-mediated activation of TGF-beta and Activin-A. *Molecular cancer*. 2015;14:162.
21. Braicu O, Pileczki V, Braicu C, Achimas-Cadariu P, Irimie A, Berindan-Neagoe I. p53 siRNA - a therapeutic tool with significant implication in the modulation of apoptosis and angiogenic pathways. *Clujul medical (1957)*. 2015;88(3):333-7.
22. Gao S, Yang C, Jiang S, Xu XN, Lu X, He YW, et al. Applications of RNA interference high-throughput screening technology in cancer biology and virology. *Protein & cell*. 2014;5(11):805-15.
23. Thompson AM, Lane DP. p53 transcriptional pathways in breast cancer: the good, the bad and the complex. *The Journal of pathology*. 2010;220(4):401-3.
24. Sharpless NE, DePinho RA. p53: good cop/bad cop. *Cell*. 2002;110(1):9-12.