
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Mecanismele etiopatogenetice ale cancerului

Doctorand **Raluca-Andrada Mureșan (căs. Munteanu)**

Conducător de doctorat Șef lucr. Dr. **Ciprian Ionuț Tomuleasa**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

MULȚUMIRI	7
INTRODUCERE	17
1. Cancerul	22
1.1. Cancerul pulmonar	23
1.1.1 Epidemiologie și factori de risc	23
1.1.2 Profilul molecular și genetic	24
1.1.3 Subtipuri histologice NSCLC și SCLC	24
1.1.4 Abordări terapeutice actuale	25
1.1.5 Biomarkeri de nouă generație în cancerul pulmonar	25
2. Mecanisme epigenetice în cancerul pulmonar	26
2.1. Introducere în epigenetică	26
2.2. Metilarea ADN	26
2.3. Modificările histonelor	27
2.4. Rolul în reprimarea și activarea genelor	28
3. Strategii terapeutice epigenetice în cancerul pulmonar	29
3.1 Terapiile epigenetice actuale	29
3.2 Mecanismele și eficacitatea terapiei epigenetice	29
3.2.1 Inhibitori ai ADN metiltransferazelor	31
3.2.2 Inhibitori ai histon-deacetilazelor	32
3.2.3 Inhibitori ai metiltransferazelor de arginină din proteine și deleția genei MTAP	33
3.3 Terapii combinate	34
3.3.1 Inhibitori ai histon-deacetilazelor și agenți chimioterapici	34
3.3.2 Modificatori genetici și inhibitori ai punctelor de control imunitar	35
3.4. Implicarea modificărilor epigenetice în dezvoltarea rezistenței la terapie în cancerul pulmonar	36
3.5 Abordări terapeutice suplimentare	37
3.5.1. Imunoterapia	37
3.5.2. Terapii bazate pe adipocite	38
4. Validarea <i>in vivo</i> a modelelor animale pentru studiile epigenetice	39
4.1 Clasificarea generală a modelelor <i>in vivo</i>	39
4.2 Validarea terapiei epigenetice utilizând modele <i>in vivo</i>	40
4.3 Aplicarea imagisticii bioluminiscente în cercetările epigenetice	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	45
1. Ipoteza și obiectivele studiului	47
2. Metodologia și designul studiului	51

3. Studiul nr. 1 - Analiza <i>in vitro</i> a 5-Aza și iradiere pe liniile celulare de cancer pulmonar	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza și obiectivele studiului	53
3.3. Materiale și metode	54
3.4. Rezultate	57
3.5. Discuții	68
3.6. Concluzii	69
4. Studiul nr. 2 – Mecanismele moleculare ale terapiei combinate cu 5-Aza și iradiere	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza și obiectivele studiului	71
4.3. Materiale și metode	72
4.4. Rezultate	75
3.5. Discuții	86
3.6. Concluzii	88
5. Studiul nr. 3 - Validarea <i>in vivo</i> a terapiei combinate cu 5-Aza și iradiere în modelele de șoarece cu cancer pulmonar	91
5.1. Introducere	91
5.2. Ipoteza și obiectivele studiului	91
5.3. Materiale și metode	92
5.4. Rezultate	95
5.5. Discuții	99
5.6. Concluzii	100
6. Concluzii generale	103
7. Originalitatea tezei și contribuțiile în domeniu	105

INTRODUCERE

Cancerul rămâne o cauză principală de deces la nivel global, cu aproximativ 20 de milioane de cazuri noi și aproape 10 milioane de decese anual, conform datelor din 2020. Cancerul pulmonar, în special, este responsabil pentru o proporție semnificativă a deceselor asociate cancerului, în mare parte din cauza depistării tardive și a naturii sale agresive. Deși cancerul de sân are cel mai mare număr de cazuri diagnosticate, cancerul pulmonar rămâne principalul vinovat al mortalității legate de cancer, cu o rată de supraviețuire de cinci ani de doar 18,5%.

Epigenetica, care se concentrează pe reglarea genelor fără modificarea secvenței ADN, joacă un rol crucial în dezvoltarea cancerului pulmonar prin mecanisme precum metilarea ADN și modificările histonelor. Aceste modificări pot altera activitatea genelor, influențând progresia cancerului și rezistența la tratament. Terapiile epigenetice, inclusiv inhibitorii de HDAC și DNMT aprobați de FDA, oferă strategii de tratament promițătoare prin reactivarea genelor supresoare tumorale.

Această teză doctorală explorează potențialul 5-azacitidinei (5-aza), un medicament epigenetic utilizat în cancerele hematologice, ca tratament pentru NSCLC. Cercetarea investighează efectele 5-aza singur și în combinație cu radiațiile ionizante (IR) pentru a demetila ADN-ul, a reactiva genele suprimate și a îmbunătăți răspunsul la tratament. Studiile au inclus analize *in vitro*, mecanisme moleculare prin QPCR și microarray și validări *in vivo* folosind modele ortotopice și subcutane de șoareci imunocompromisi. Terapia combinată își propune să reducă creșterea tumorii și metastazele, propunând abordări inovatoare pentru rezultate mai bune în NSCLC.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul pulmonar, o malignitate cu un impact semnificativ asupra sănătății și ratei de supraviețuire, se caracterizează printr-o variabilitate genetică și epigenetică notabilă. Această diversitate influențează progresia bolii, metastazarea și răspunsul la tratament. Modificările genetice și epigenetice, cum ar fi metilarea ADN-ului și modificările histonelor, contribuie la heterogenitatea tumorală, fiind mai frecvente decât mutațiile somatice și având un rol esențial în dezvoltarea și progresia bolii.

Evaluarea și diagnosticarea cancerului pulmonar se bazează pe o abordare multimodală, care include atât tehnici imagistice, cât și analize moleculare și genetice pentru o stadializare precisă și planificarea tratamentului. Aceste metode permit o mai bună înțelegere a variabilității tumorale și ajută la personalizarea tratamentului în funcție de caracteristicile individuale ale pacientului și tumorii.

Modificările epigenetice, cum ar fi metilarea ADN și modificările histonice, joacă un rol crucial în reglarea expresiei genelor implicate în cancerul pulmonar. Aceste procese influențează proliferarea celulară, apoptoza și ciclul celular, perturbând căi de semnalizare precum MAPK/ERK și PI3K/AKT, care sunt critice pentru progresia cancerului și rezistența la tratament. Metilarea promotorilor genelor supresoare tumorale, cum ar fi RASSF1 și PTEN, duce la inactivarea acestora și la progresia tumorală, în timp ce demetilarea poate activa oncogenele, contribuind la evoluția cancerului.

Biomarkerii epigenetici oferă informații valoroase pentru diagnostic și monitorizarea răspunsului la tratament. Expresia modificatorilor epigenetici, precum deacetilazele histonice, este esențială pentru a evalua sensibilitatea la terapiile epigenetice și pentru personalizarea tratamentului. Măsurarea nivelurilor de metilare și analiza histonelor ajută la stratificarea pacienților și la anticiparea eficacității tratamentelor, contribuind la îmbunătățirea rezultatelor clinice.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVE

Teza propune ipoteza că 5-azacitidina (5-Aza), un agent epigenetic aprobat pentru tratamente hematologice, poate exercita efecte terapeutice semnificative în cancerul pulmonar non-microcelular (NSCLC) atât ca monoterapie, cât și în combinație cu iradierea (IR). Se anticipează că 5-Aza ar putea demetila ADN-ul, reactiva genele supresoare tumorale și spori sensibilitatea celulelor tumorale la radiație, ducând astfel la o inhibare mai eficientă a creșterii tumorale și a metastazării.

Obiectivele generale ale studiilor:

- **Evaluarea eficienței terapeutice a 5-Aza în tratamentul NSCLC**
 - Analiza efectelor 5-Aza asupra celulelor NSCLC la nivel de expresie genică și epigenetică, cu scopul de a identifica modul în care acest agent poate modifica profilul tumoral.
 - Determinarea efectului 5-Aza asupra viabilității celulare, migrării, capacității de formare a coloniilor și apoptozei în modelele de cancer pulmonar.
- **Investigația mecanismelor moleculare ale terapiei combinate cu 5-Aza și IR**
 - Identificarea și analiza căilor moleculare influențate de 5-Aza în combinație cu IR, incluzând gene și căi specifice implicate în apoptoză, răspunsul imun și reglarea ciclului celular.
 - Validarea rezultatelor microarray prin PCR cantitativ pentru a confirma modificările de expresie genică induse de tratamentul combinat.
- **Validarea *in vivo* a efectelor 5-Aza și IR asupra tumorilor în modelele animale de NSCLC**
 - Evaluarea impactului 5-Aza, singur și în combinație cu IR, asupra creșterii tumorale și progresiei bolii în modelele xenogrefate subcutanate și ortotopice.
 - Monitorizarea toxicității sistemice și a toleranței generale la tratament pentru a stabili siguranța și fezabilitatea clinică a 5-Aza în tratamentele pentru cancerul pulmonar.

1. METODOLOGIA GENERALĂ

În cadrul acestei cercetări, au fost utilizate tehnici avansate pentru a evalua efectele terapeutice ale 5-aza în tratamentul cancerului pulmonar non-microcelular (NSCLC), atât singur cât și în combinație cu radiația ionizantă (IR). Experimentele au fost efectuate pe linii celulare NSCLC și pe modele de șoareci xenogrefați, urmând standardele etice impuse de directiva 63/2010 a Uniunii Europene. Diverse metode, inclusiv microarray, RT-QPCR și microscopia, au permis analizarea în profunzime a modificărilor moleculare și fiziologice asociate tratamentului.

2. STUDIUL 1. ANALIZA *IN VITRO* A EFECTELOR 5-AZA ȘI IR ASUPRA LINIILOR CELULARE NSCLC

2.1 INTRODUCERE

Cancerul pulmonar rămâne una dintre principalele cauze de mortalitate legate de cancer la nivel mondial, iar cancerul pulmonar non-microcelular (NSCLC) reprezintă majoritatea cazurilor. Deși strategiile de tratament au avansat, prognosticul pentru pacienții cu cancer pulmonar rămâne nefavorabil, subliniind necesitatea unor abordări terapeutice mai eficiente. Un domeniu promițător implică utilizarea modificatorilor epigenetici precum 5-aza, capabili să demetileze ADN-ul și să reactiveze genele silenced, restabilind astfel funcțiile celulare normale și potențial mărind eficacitatea tratamentelor existente, cum ar fi radiația ionizantă (IR).

Studiile recente au arătat potențialul terapiei epigenetice combinate cu tratamentele tradiționale pentru a spori rezultatele terapeutice. Cu toate acestea, efectele specifice și mecanismele acestor terapii combinate asupra celulelor NSCLC necesită cercetări suplimentare. Acest studiu explorează impactul 5-aza, administrat singur și în combinație cu IR, asupra mai multor linii celulare NSCLC, concentrându-se pe viabilitatea celulară, migrația și potențialul clonogenic.

2.2 IPOTEZA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Considerând posibilele efecte sinergice ale 5-Aza și IR în tratamentul cancerului, ipoteza presupune că administrarea combinată a celor doi agenți terapeutici poate genera un efect sinergic, rezultând într-o inhibare mai pronunțată a migrației, viabilității și formării coloniilor celulelor NSCLC, comparativ cu administrarea fiecărui tratament separat.

Obiectivele primare ale studiului au fost:

- Determinarea concentrației inhibitorii medii (IC50) a 5-aza pentru liniile celulare A549, SK-MES-1, H1792 și H522 pentru a stabili o bază pentru experimentele ulterioare.
- Evaluarea potențialului clonogenic prin testarea formării de colonii pentru a analiza capacitatea celulelor NSCLC de a forma colonii după tratamentul cu 5-aza, IR și combinația acestora.
- Investigarea migrației celulare prin teste de tip „wound healing” și migrație transwell pentru a analiza capacitatea celulelor A549 de a migra sub influența tratamentelor.
- Observarea modificărilor morfologice și funcționale cu ajutorul microscopiei cu fluorescență și confocale.

- Cuantificarea apoptozei prin citometrie de flux pentru a analiza mecanismele de moarte celulară induse de tratamente.

2.3 MATERIALE ȘI METODE

- *Condiții de cultivare a liniilor celulare NSCLC*

Liniile celulare A549, A549-luc2, SK-MES-1, H1792 și H522 au fost utilizate în experimente. A549 și A549-luc2 au fost cultivate în mediu F-12K cu 10% ser fetal bovin (FBS), H1792 și H522 în mediu RPMI-1640 cu 10% FBS, iar SK-MES-1 în mediu EMEM cu 10% FBS, toate la 37°C în atmosferă umidificată cu 5% CO₂.

- *Protocoale de tratament*

Studiul a inclus două protocoale de tratament: un protocol cu doză unică de 5-aza și IR și un altul cu două doze de 5-aza combinate cu IR (2 GY). Viabilitatea celulară a fost evaluată prin teste de tip MTT pentru determinarea IC₅₀.

- *Evaluarea migrației și formării coloniilor*

Testele de migrație au inclus metode de „wound healing” și transwell, iar evaluarea formării coloniilor a fost realizată pentru a analiza impactul tratamentelor pe termen lung asupra capacitații de supraviețuire a celulelor.

- *Analize microscopice și citometrice*

Modificările morfologice au fost studiate prin microscopie confocală, iar apoptoza a fost cuantificată prin citometrie de flux utilizând colorarea cu annexin V-FITC.

2.4 REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinarea IC₅₀ pentru 5-aza a arătat sensibilități diferite între liniile celulare NSCLC, cu valori variind de la 1471 nm la 2218 nm. Linia celulară A549 a prezentat o scădere semnificativă dependentă de doză a viabilității. Testele de formare a coloniilor au demonstrat că tratamentele combinate au redus semnificativ numărul și dimensiunea coloniilor comparativ cu tratamentele separate.

Testele de migrație au evidențiat că tratamentul combinat a inhibat mai eficient capacitatea celulelor A549 de a migra și de a se reface în cadrul experimentului „wound healing”. Analizele microscopice au arătat modificări semnificative în structura citoscheletală, iar analizele citometrice au confirmat creșterea apoptozei în grupul tratat cu 5-aza și IR.

2.5 CONCLUZII

Acest studiu demonstrează că combinarea 5-aza cu IR are un efect sinergic asupra celulelor NSCLC, conducând la inhibarea crescută a viabilității, migrației și formării coloniilor, precum și la creșterea apoptozei. Rezultatele sugerează că terapia epigenetică, combinată cu radioterapia, ar putea reprezenta o strategie terapeutică mai eficientă în tratamentul cancerului pulmonar.

3. STUDIUL 2. MECANISMELE MOLECULARE ALE TERAPIEI COMBinate 5-AZA ȘI IR

3.1 IPOTEZA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Acest studiu își propune să investigheze impactul molecular al tratamentului cu 5-aza asupra liniei celulare A549 de NSCLC, analizând modificările de expresie genică prin microarray și validând rezultatele prin pcr cantitativ (qPCR). Integrarea acestor analize oferă o înțelegere mai profundă a mecanismelor epigenetice și transcripționale implicate și contribuie la elucidarea potențialului 5-aza ca agent terapeutic epigenetic.

3.2 MATERIALE ȘI METODE

În analiza microarray, ARN-ul total a fost extras din celulele A549 tratate folosind Trireagent, urmată de purificare cu kitul RNeasy mini. Calitatea ARN-ului a fost evaluată cu spectrofotometrul nanodrop și bioanalyzer. Expresia genică a fost analizată prin metodologia microarray Agilent cu hibridizare la 65°C timp de 17 ore și scanare ulterioară. Datele au fost normalizate și analizate cu software-ul Genespring GX.

Pentru extracția ARN-ului, celulele A549 au fost tratate cu Triplextactor, iar ARN-ul a fost purificat și tratat cu dnase pentru a elimina contaminarea cu ADN genomic. ARN-ul purificat a fost convertit în cADN folosind un kit de sinteză, urmat de diluție și utilizare în experimentele de RT-PCR. RT-PCR-ul a fost efectuat pe plăci de 96 de godeuri cu mixul Sybr Green pentru cuantificarea expresiei genice, cu un program de amplificare standardizat și analiză de curbe de topire pentru validarea specificității.

3.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza microarray a relevat modificări extinse ale expresiei genice în celulele A549 tratate cu 5-Aza. Dintre cele 10.013 gene analizate, un număr semnificativ a prezentat schimbări în expresie (valoarea p medie = 0.0029), ceea ce indică un răspuns celular robust. Dintre acestea, 5.209 gene au fost suprarreglate, majoritatea fiind implicate în răspunsuri la stres și căi apoptotice, în timp ce 4.804 gene au fost subreglate, fiind asociate în principal cu proliferarea celulară.

Enrichment analysis a evidențiat prezența crescută a genelor legate de apoptoză, plasându-le în partea superioară a listei clasificate. De asemenea, a fost observată o reprezentare semnificativă a genelor implicate în semnalizarea JAK/STAT, sugerând un efect al 5-Aza asupra acestor căi de semnalizare.

Analiza detaliată a arătat subreglarea semnificativă a genelor implicate în reglarea ciclului celular și supraviețuirea, cum ar fi *PIM1* și *BCL3*, în grupul tratat cu 5-Aza și IR comparativ cu grupul de control. *PIM1* a prezentat o scădere de 3,51 ori (log FC = -1,81, p corectat = 1,18E-04), iar *BCL3* a avut o scădere de 3,57 ori (log FC = -1,83, p corectat = 5,13E-05).

Pe de altă parte, genele legate de răspunsul imun, cum ar fi *TBX21*, au fost suprarreglate semnificativ (FC de 55,02; log FC = 5,78, p = 7,47E-05), în timp ce *STAT3*, un mediator al apoptozei și răspunsului imun, a fost subreglat (FC de -2,01; log FC = -1,01, p = 8,86E-04).

Pentru validarea acestor rezultate, s-au selectat zece gene esențiale pentru analiza prin qPCR, inclusiv *PIM*, *BCL3*, *TBX21*, *FOXO3*, *IL1B*, *GATA3*, *ID2*, *SMAD7*, *STAT3* și *ID4*. Datele obținute au confirmat consistența schimbărilor în expresia genică evidențiată de microarray. Spre exemplu, *IL1B* a prezentat o scădere semnificativă a expresiei (P = 0.0012), în timp ce *FOXO3*, implicat în apoptoză, a arătat o creștere a expresiei (P = 0.0008). De asemenea, *GATA3*, important pentru diferențierea celulelor imune, a fost suprarreglat (P = 0.0023).

Analiza comparativă dintre datele microarray și qPCR a arătat o corelație puternică între cele două metode, confirmând robustețea și fiabilitatea rezultatelor.

3.4 CONCLUZII

Acest studiu evidențiază modificările transcripționale și epigenetice semnificative induse de tratamentul cu 5-Aza în celulele A549 de cancer pulmonar. Analiza genelor prin microarray, validate prin qPCR, a arătat că 5-Aza influențează numeroase gene implicate în apoptoză, răspunsul imun, reglarea ciclului celular și diferențiere, sugerând capacitatea sa de a suprima căile oncogenice și de a activa mecanismele de apărare celulară. Integrarea datelor *in vitro* cu cele extrase din Atlasul Genomic al Cancerului pentru adenocarcinomul pulmonar a subliniat relevanța clinică a acestor rezultate. Din aceiași baza de date, analiza metilării diferențiale a evidențiat regiuni hiper- și hipo-metilate, indicând potențialul 5-Aza de a reprograma epigenetic celulele canceroase, sugerând astfel utilitatea sa ca agent terapeutic epigenetic promițător pentru NSCLC.

4. STUDIUL 3. VALIDAREA *IN VIVO* A TERAPIEI 5-AZA ȘI IR

4.1 IPOTEZA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Ipoteza studiului a fost că 5-Aza, administrată singură sau în combinație cu IR, va reduce eficient creșterea tumorii în modelele de NSCLC. Obiectivele principale au inclus evaluarea impactului 5-Aza asupra creșterii tumorilor în modelele xenogrefate subcutanate și ortotopice și compararea eficienței tratamentului ca monoterapie și în combinație cu IR. Un alt obiectiv a fost monitorizarea progresiei tumorale și evaluarea toxicității sistemice prin măsurători de greutate corporală și starea generală de sănătate. Examinările histologice au fost utilizate pentru a oferi detalii asupra răspunsurilor celulare din țesuturile tumorale. Studiul a avut ca scop corelarea rezultatelor *in vivo* cu cele *in vitro*, pentru a susține aplicarea translatională a terapiilor pe bază de 5-Aza în tratamentul cancerului pulmonar.

4.2 MATERIALE ȘI METODE

Studiul a utilizat șoareci de Atimici nuzi (imunocompromiși), pentru a permite dezvoltarea tumorilor umane și testarea eficacității tratamentelor. Aceștia au fost menținuți în condiții standard de laborator, cu un ciclu de lumină/întuneric de 12 ore, temperatură controlată de 22°C și umiditate relativă de 50-60%. Toți șoarecii au avut acces ad libitum la hrană și apă. Protocolul experimental a respectat reglementările etice pentru utilizarea animalelor în cercetare și a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”.

Modelul xenogrefat subcutanat a implicat injectarea de celule A549 în flancul drept al șoarecilor, iar creșterea tumorilor a fost monitorizată timp de 30 de zile. Grupurile de tratament au inclus control, IR, 5-Aza și combinația 5-Aza + IR. În modelul xenogrefat ortotopic, celulele A549-Luc2 au fost injectate în plămânu drept, iar tratamentul a constat în doze bi-săptămânale de 5-Aza. Progresia tumorii a fost monitorizată prin imagistică BLI, iar greutatea corporală și starea de sănătate au fost urmărite pentru a evalua efectele sistemice. Analiza histologică a fost realizată prin colorarea H&E pentru a observa modificările celulare și markerii de proliferare.

4.3 REZULTATE ȘI DISCUȚII

În modelul xenogrefat subcutanat, tratamentul cu 5-Aza, atât singur, cât și combinat cu IR, a inhibat semnificativ creșterea tumorilor comparativ cu grupurile de control și cele tratate doar cu IR. Tumorile din grupul de control au crescut agresiv, în timp ce grupurile tratate cu 5-Aza au arătat o supresie notabilă a tumorilor, iar în unele cazuri, tumorile nu au fost vizibile. Analiza histologică a indicat proliferarea celulară dezorganizată în țesuturile tratate cu IR, în timp ce tratamentele cu 5-Aza au arătat o reducere a proliferării și semne de deteriorare celulară. Greutatea corporală a rămas stabilă pe parcursul studiului, sugerând că tratamentele au fost bine tolerate, fără toxicitate sistemică semnificativă.

În modelul xenogrefat ortotopic, rezultatele BLI au arătat o reducere marcată a intensității bioluminescenței în grupul tratat cu 5-Aza, corelând cu o reducere a sarcinii tumorale primare. Acest model a confirmat eficacitatea tratamentului, fără tumori macroscopice vizibile la final. Greutatea corporală a fost stabilă, indicând o toleranță bună și toxicitate minimă. Examinarea macroscopică a țesuturilor pulmonare a confirmat reducerea tumorilor, fără modificări în alte organe.

Rezultatele au demonstrat că 5-Aza reduce eficient creșterea tumorilor în NSCLC, în special atunci când este combinată cu IR. Tratamentele nu au indus toxicitate sistemică semnificativă, ceea ce subliniază potențialul acestei terapii pentru aplicare clinică. Modelul ortotopic a validat relevanța clinică a efectelor anti-tumorale ale 5-Aza, iar rezultatele în ansamblu susțin continuarea cercetărilor pentru optimizarea regimurilor de tratament.

4.4 CONCLUZII

Studiul a evidențiat potențialul terapeutic al 5-Aza în modelele NSCLC, demonstrând reducerea semnificativă a creșterii tumorale, cu eficacitate sporită în combinație cu IR. Tratamentele au fost bine tolerate, fără toxicitate sistemică semnificativă. Rezultatele sugerează că 5-Aza poate sensibiliza celulele tumorale la radiații, permițând reducerea dozelor de IR în practică clinică.

CONCLUZII GENERALE

Această teză de doctorat a adus contribuții valoroase în înțelegerea mecanismelor etiopatogenetice ale NSCLC și a potențialului terapeutic al 5-aza ca agent epigenetic, atât individual, cât și în combinație cu iradierea. Printr-o serie de studii *in vitro* și *in vivo*, completate de analize bioinformatic, cercetarea a evidențiat efectele sinergice ale 5-aza în NSCLC, reușind să reactiveze gene supresoare tumorale și să reprime căile oncogenice.

Un rezultat important al acestei lucrări a fost demonstrat de efectul combinat al 5-aza cu iradierea, care a dus la o inhibare accentuată a viabilității celulare, migrării și formării coloniilor. Studiile de transcripție au arătat că 5-aza contribuie la reprogramarea genetică a celulelor canceroase, activând gene asociate apoptozei, răspunsului imun și suprimării tumorale.

Studiul nostru a validat aceste efecte și prin experimente pe modele de șoareci xenogrefați, atât subcutanate, cât și ortotopice, unde s-a observat o reducere semnificativă a creșterii tumorale și a metastazelor, cu o toxicitate sistemică minimă. Studiul de față explorează combinația cu IR și oferă o nouă abordare pentru creșterea eficacității tratamentului.

Comparativ, studiile anterioare au utilizat modele similare pentru a evalua impactul 5-aza, relevând versatilitatea acestei terapii în diferite tipuri de cancer. Această teză aduce un punct de referință în NSCLC, aplicând o abordare duală – modele subcutanate și ortotopice – pentru a evalua impactul 5-aza. Această strategie comprehensivă a permis o înțelegere detaliată a modului în care 5-aza poate modifica fenotipul tumoral și potența răspunsurile la tratamentele convenționale. În concluzie, această teză oferă o bază solidă pentru utilizarea 5-aza în tratamentul NSCLC și propune noi strategii terapeutice personalizate. Sinergia demonstrată între 5-aza și IR, precum

și identificarea biomarkerilor potențiali, deschid perspective promițătoare pentru tratamente mai eficiente în acest tip de cancer.

5. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Datele prezentate în această teză și în articolele rezultate reprezintă, după cunoștințele noastre, prima examinare cuprinzătoare a interacțiunii dintre modificările epigenetice, concentrându-se pe 5-Aza și IR, în NSCLC. Pe măsură ce mecanismele de reglementare epigenetică în oncogeneză sunt elucidate, această cercetare oferă perspective critice asupra modului în care aceste modificări pot influența comportamentul tumorii și răspunsul terapeutic.

Deși studii anterioare au identificat diverse alterări epigenetice în cancerul pulmonar, puține au validat riguros implicațiile funcționale ale acestor modificări, în special în ceea ce privește efectele lor asupra expresiei genice și a căilor celulare. Descoperirile noastre ilustrează capacitatea 5-Aza de a demetila ADN-ul și de a reactiva genele supresoare tumorale silențiate, evidențiind procesele celulare specifice afectate de aceste schimbări. Analiza detaliată a modului în care 5-Aza îmbunătățește eficacitatea tratamentului cu IR aduce o contribuție semnificativă la înțelegerea abordărilor terapeutice.

PhD Thesis

Etiopathogenetic mechanisms of cancer

PhD Candidate **Raluca-Andrada Mureşan (căs. Munteanu)**

Thesis Coordinator Şef lucr. Dr. **Ciprian Ionuţ Tomuleasa**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

ACKNOWLEDGMENTS	7
INTRODUCTION	17
1. Cancer	22
1.1. Lung cancer	23
1.1.1 Epidemiology and Risk Factors	23
1.1.2 Molecular and Genetic Landscape	24
1.1.3 Histological Subtypes: NSCLC and SCLC	24
1.1.4 Current Therapeutic Approaches	25
1.1.5 Next Generation Biomarkers in Lung Cancer	25
2. Epigenetic Mechanisms in Lung Cancer	26
2.1. Introduction to Epigenetics	26
2.2. DNA Methylation	26
2.3. Histone Modifications	27
2.4 Role in Gene Silencing and Activation	28
3. Epigenetic Therapeutic Strategies in Lung Cancer	29
3.1 Current Epigenetic Therapies	29
3.2 Mechanisms and Efficacy of Epigenetic Drugs	29
3.2.1 DNMT inhibitors	31
3.2.2 HDAC inhibitors	32
3.2.3 PRMT Inhibitors and MTAP Deletion in Lung Cancer	33
3.3 Combination Therapies	34
3.3.1 HDAC Inhibitors and Chemotherapy	34
3.3.2 Epigenetic Modifiers and Immune Checkpoint Inhibitors	35
3.4. Involvement of Epigenetic Modifications in the Development of Lung Cancer Drug Resistance	36
3.5 Additional Therapeutic Approaches	37
3.5.1. Immunotherapy	37
3.5.2. Adipocyte-Based Therapies	38
4. In Vivo Validation of Models for Epigenetic Studies	39
4.1 Classification of In Vivo Models	39
4.2 Validation of Epigenetic Therapies Using In Vivo Models	40
4.3 Application of Bioluminescent Imaging in Epigenetic Research	40
PERSONAL CONTRIBUTION	45
1. Hypothesis and goals of the study	47
2. Methodology and design of the study	51

3. Study nr. 1 - <i>In vitro</i> Analysis of 5-Aza and IR on NSCLC cell lines	53
3.1. Introduction	53
3.2. Hypothesis and goals of the study	53
3.3. Materials and Methods	54
3.4 Results	57
3.5 Discussions	68
3.6 Conclusions	69
4. Study nr. 2 - Molecular Mechanisms of 5-Aza and IR combination Therapy	71
4.1. Introduction	71
4.2. Hypothesis and goals of the study	71
4.3. Materials and methods	72
4.4. Results	75
3.5. Discussion	86
3.6. Conclusion	88
5. Study nr. 3 - <i>In vivo</i> Validation of combined 5-Aza and IR Therapy in NSCLC Mouse Models	91
5.1. Introduction	91
5.2. Hypothesis and goals of the study	91
5.3. Materials and methods	92
5.4 Results	95
5.5. Discussion	99
5.6. Conclusion	100
6. General conclusions	103
7. Thesis originality and contributions to the field	105

INTRODUCTION

Cancer remains a leading cause of death globally, with approximately 20 million new cases and nearly 10 million deaths annually, according to data from 2020. Lung cancer, in particular, accounts for a significant proportion of cancer-related deaths, largely due to late detection and its aggressive nature. Although breast cancer has the highest number of diagnosed cases, lung cancer remains the primary cause of cancer mortality, with a five-year survival rate of only 18.5%.

Epigenetics, which focuses on gene regulation without altering the DNA sequence, plays a crucial role in lung cancer development through mechanisms such as DNA methylation and histone modifications. These modifications can alter gene activity, influencing cancer progression and treatment resistance. Epigenetic therapies, including FDA-approved HDAC and DNMT inhibitors, offer promising treatment strategies by reactivating tumor suppressor genes.

This doctoral thesis explores the potential of 5-azacitidine (5-Aza), an epigenetic drug used in hematologic cancers, as a treatment for NSCLC. The research investigates the effects of 5-Aza alone and in combination with ionizing radiation (IR) to demethylate DNA, reactivate suppressed genes, and improve treatment response. Studies included in vitro analyses, molecular mechanisms via QPCR and microarray, and in vivo validations using orthotopic and subcutaneous immunocompromised mouse models. Combined therapy aims to reduce tumor growth and metastases, proposing innovative approaches for improved outcomes in NSCLC.

Current state of knowledge

Lung cancer, a malignancy with significant health impact and survival rate implications, is characterized by notable genetic and epigenetic variability. This diversity influences disease progression, metastasis, and treatment response. Genetic and epigenetic changes, such as DNA methylation and histone modifications, contribute to tumor heterogeneity, being more frequent than somatic mutations and playing an essential role in disease development and progression.

The evaluation and diagnosis of lung cancer rely on a multimodal approach, which includes both imaging techniques and molecular and genetic analyses for precise staging and treatment planning. These methods enable a better understanding of tumor variability and help personalize treatment based on the individual characteristics of the patient and tumor.

Epigenetic changes, such as DNA methylation and histone modifications, play a crucial role in regulating gene expression involved in lung cancer. These processes influence cellular proliferation, apoptosis, and the cell cycle, disrupting signaling pathways such as MAPK/ERK and PI3K/AKT, which are critical for cancer progression and treatment resistance. Methylation of tumor suppressor gene promoters, such as RASSF1 and PTEN, leads to their inactivation and tumor progression, while demethylation can activate oncogenes, contributing to cancer evolution.

Epigenetic biomarkers provide valuable information for diagnosis and treatment response monitoring. The expression of epigenetic modifiers, such as histone deacetylases, is essential for assessing sensitivity to epigenetic therapies and for personalizing treatment. Measuring methylation levels and analyzing histones help stratify patients and anticipate treatment efficacy, contributing to improved clinical outcomes.

PERSONAL CONTRIBUTION

WORKING HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

The thesis proposes the hypothesis that 5-azacitidine (5-Aza), an epigenetic agent approved for hematologic treatments, can exert significant therapeutic effects in non-small cell lung cancer (NSCLC), both as monotherapy and in combination with irradiation (IR). It is anticipated that 5-Aza could demethylate DNA, reactivate tumor suppressor genes, and enhance the sensitivity of tumor cells to radiation, leading to more effective inhibition of tumor growth and metastasis.

General objectives of the studies:

- **Evaluation of the therapeutic efficacy of 5-Aza in NSCLC treatment**
 - Analysis of 5-Aza effects on NSCLC cells at the gene expression and epigenetic levels to identify how this agent can alter the tumor profile.

- Determination of 5-Aza effects on cellular viability, migration, colony formation capacity, and apoptosis in lung cancer models.
- **Investigation of molecular mechanisms in combined 5-Aza and IR therapy**
 - Identification and analysis of molecular pathways influenced by 5-Aza in combination with IR, including specific genes and pathways involved in apoptosis, immune response, and cell cycle regulation.
 - Validation of microarray results via quantitative PCR to confirm gene expression changes induced by combined treatment.
- **In vivo validation of 5-Aza and IR effects on tumors in NSCLC animal models**
 - Evaluation of 5-Aza impact, alone and in combination with IR, on tumor growth and disease progression in subcutaneous and orthotopic xenograft models.
 - Monitoring systemic toxicity and overall treatment tolerance to establish the safety and clinical feasibility of 5-Aza in lung cancer treatments.

1. GENERAL METHODOLOGY

In this research, advanced techniques were used to evaluate the therapeutic effects of 5-Aza in treating non-small cell lung cancer (NSCLC), both alone and in combination with ionizing radiation (IR). Experiments were conducted on NSCLC cell lines and xenografted mouse models, following the ethical standards imposed by EU Directive 63/2010. Various methods, including microarray, RT-QPCR, and microscopy, enabled in-depth analysis of the molecular and physiological changes associated with treatment.

2. STUDY 1: IN VITRO ANALYSIS OF 5-AZA AND IR EFFECTS ON NSCLC CELL LINES

2.1 INTRODUCTION

Lung cancer remains one of the leading causes of cancer-related mortality worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for most cases. Although treatment strategies have advanced, the prognosis for lung cancer patients remains unfavorable, highlighting the need for more effective therapeutic approaches. A promising area involves using epigenetic modifiers such as 5-Aza, which can demethylate DNA and reactivate silenced genes, thus restoring normal cellular functions and potentially enhancing the efficacy of existing treatments, such as ionizing radiation (IR).

Recent studies have shown the potential of combined epigenetic therapy with traditional treatments to enhance therapeutic outcomes. However, the specific effects and mechanisms of these combined therapies on NSCLC cells require further investigation. This study explores the impact of 5-Aza, administered alone and in combination with IR, on several NSCLC cell lines, focusing on cell viability, migration, and clonogenic potential.

2.2 STUDY HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Considering the possible synergistic effects of 5-Aza and IR in cancer treatment, the hypothesis is that the combined administration of these two therapeutic agents may generate a synergistic effect, resulting in a more pronounced inhibition of migration, viability, and colony formation of NSCLC cells compared to each treatment administered separately.

The primary objectives of this study:

- Determination of the median inhibitory concentration (IC50) of 5-Aza for A549, SK-MES-1, H1792, and H522 cell lines to establish a basis for further experiments.
- Evaluation of clonogenic potential through colony formation testing to analyze the ability of NSCLC cells to form colonies after treatment with 5-Aza, IR, and their combination.
- Investigation of cellular migration through “wound healing” and transwell migration tests to analyze the capacity of A549 cells to migrate under the influence of treatments.
- Observation of morphological and functional changes using fluorescence and confocal microscopy.
- Quantification of apoptosis through flow cytometry to analyze cell death mechanisms induced by treatments.

2.3 MATERIALS AND METHODS

Conditions for Culturing NSCLC Cell Lines

The A549, A549-luc2, SK-MES-1, H1792, and H522 cell lines were used in experiments. A549 and A549-luc2 were cultured in F-12K medium with 10% fetal bovine serum (FBS), H1792 and H522 in RPMI-1640 medium with 10% FBS, and SK-MES-1 in EMEM medium with 10% FBS, all at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Treatment Protocols

The study included two treatment protocols: a single dose of 5-Aza and IR and another with two doses of 5-Aza combined with IR (2 Gy). Cell viability was evaluated through MTT assays to determine IC₅₀.

Evaluation of Migration and Colony Formation

Migration tests included wound healing and transwell methods, and colony formation evaluation was conducted to analyze the long-term impact of treatments on cell survival capacity.

Microscopic and Cytometric Analyses

Morphological changes were studied by confocal microscopy, and apoptosis was quantified through flow cytometry using annexin V-FITC staining.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

The determination of IC₅₀ for 5-Aza revealed varying sensitivities among NSCLC cell lines, with values ranging from 1471 nm to 2218 nm. The A549 cell line showed a significant dose-dependent reduction in viability. Colony formation assays demonstrated that combined treatments significantly reduced the number and size of colonies compared to separate treatments.

Migration assays highlighted that the combined treatment more effectively inhibited the migration capacity of A549 cells and reduced the wound healing process. Microscopic analyses revealed significant changes in cytoskeletal structure, while flow cytometry analyses confirmed increased apoptosis in the group treated with 5-Aza and IR.

2.5 CONCLUSIONS

This study demonstrates that the combination of 5-Aza with IR has a synergistic effect on NSCLC cells, leading to enhanced inhibition of viability, migration, and colony formation, as well as increased apoptosis. The results suggest that epigenetic therapy combined with radiotherapy could represent a more effective therapeutic strategy in lung cancer treatment.

3. STUDY 2: MOLECULAR MECHANISMS OF COMBINED 5-AZA AND IR THERAPY

3.1 STUDY HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

This study aims to investigate the molecular impact of 5-Aza treatment on the A549 NSCLC cell line, analyzing gene expression changes through microarray and validating results with quantitative PCR (qPCR). Integrating these analyses provides a deeper understanding of the involved epigenetic and transcriptional mechanisms and contributes to elucidating the potential of 5-Aza as an epigenetic therapeutic agent.

3.2 MATERIALS AND METHODS

For microarray analysis, total RNA was extracted from treated A549 cells using Trizol, followed by purification with the RNeasy mini kit. RNA quality was evaluated with the Nanodrop spectrophotometer and bioanalyzer. Gene expression was analyzed via Agilent microarray methodology with hybridization at 65°C for 17 hours and subsequent scanning. Data were normalized and analyzed using Genespring GX software.

For RNA extraction, A549 cells were treated with Triplextractor, purified, and treated with DNase to remove genomic DNA contamination. The purified RNA was converted to cDNA using a synthesis kit, diluted, and used in RT-PCR experiments. RT-PCR was performed on 96-well plates with the Sybr Green mix for gene expression quantification, with a standardized amplification program and melting curve analysis for specificity validation.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

Microarray analysis revealed extensive gene expression changes in A549 cells treated with 5-Aza. Of the 10,013 genes analyzed, a significant number showed expression changes (average p-value = 0.0029), indicating a robust cellular response. Among these, 5,209 genes were upregulated, mostly involved in stress responses and apoptotic pathways, while 4,804 genes were downregulated, mainly associated with cellular proliferation.

Enrichment analysis showed an increased presence of apoptosis-related genes, placing them at the top of the ranked list. Additionally, a significant representation of genes involved in JAK/STAT signaling was observed, suggesting an

effect of 5-Aza on these pathways.

Detailed analysis showed significant downregulation of genes involved in cell cycle regulation and survival, such as PIM1 and BCL3, in the 5-Aza and IR treatment group compared to the control group. PIM1 showed a 3.51-fold decrease (log FC = -1.81, adjusted p = 1.18E-04), and BCL3 had a 3.57-fold decrease (log FC = -1.83, adjusted p = 5.13E-05). On the other hand, immune response-related genes, such as TBX21, were significantly upregulated (FC = 55.02; log FC = 5.78, p = 7.47E-05), while STAT3, a mediator of apoptosis and immune response, was downregulated (FC = -2.01; log FC = -1.01, p = 8.86E-04).

For validation, ten key genes were selected for qPCR analysis, including PIM, BCL3, TBX21, FOXO3, IL1B, GATA3, ID2, SMAD7, STAT3, and ID4. The data obtained confirmed the consistency of the gene expression changes indicated by microarray. For example, IL1B showed a significant decrease in expression (P = 0.0012), while FOXO3, involved in apoptosis, showed an increase in expression (P = 0.0008). Furthermore, GATA3, important for immune cell differentiation, was upregulated (P = 0.0023).

The comparative analysis between microarray and qPCR data revealed a strong correlation between the two methods, confirming the robustness and reliability of the results.

3.4 CONCLUSIONS

This study highlights significant transcriptional and epigenetic changes induced by 5-Aza treatment in A549 lung cancer cells. Gene analysis via microarray, validated by qPCR, showed that 5-Aza influences numerous genes involved in apoptosis, immune response, cell cycle regulation, and differentiation, suggesting its ability to suppress oncogenic pathways and activate cellular defense mechanisms. Integrating in vitro data with those extracted from the Cancer Genome Atlas for lung adenocarcinoma underlined the clinical relevance of these findings. Differential methylation analysis from the same database indicated hyper- and hypomethylated regions, suggesting 5-Aza's potential to reprogram cancer cells epigenetically, thus supporting its use as a promising epigenetic therapeutic agent for NSCLC.

4. STUDY 3: IN VIVO VALIDATION OF 5-AZA AND IR THERAPY

4.1 STUDY HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

The study hypothesized that 5-Aza, administered alone or in combination with IR, would effectively reduce tumor growth in NSCLC models. The primary objectives included evaluating the impact of 5-Aza on tumor growth in subcutaneous and orthotopic xenograft models and comparing treatment efficacy as monotherapy and in combination with IR. Another objective was to monitor tumor progression and evaluate systemic toxicity through body weight measurements and overall health assessment. Histological examinations were conducted to provide details on cellular responses in tumor tissues. The study aimed to correlate in vivo results with in vitro findings to support the translational application of 5-Aza-based therapies in lung cancer treatment.

4.2 MATERIALS AND METHODS

The study utilized athymic nude mice (immunocompromised) to allow for human tumor development and treatment efficacy testing. They were maintained in standard laboratory conditions, with a 12-hour light/dark cycle, controlled temperature of 22°C, and relative humidity of 50-60%. All mice had ad libitum access to food and water. The experimental protocol complied with ethical regulations for animal use in research and was approved by the Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy.

The subcutaneous xenograft model involved injecting A549 cells into the right flank of the mice, and tumor growth was monitored over 30 days. Treatment groups included control, IR, 5-Aza, and the combination 5-Aza + IR. In the orthotopic xenograft model, A549-Luc2 cells were injected into the right lung, and treatment consisted of biweekly doses of 5-Aza. Tumor progression was monitored via BLI imaging, while body weight and health status were tracked to assess systemic effects. Histological analysis was conducted using H&E staining to observe cellular changes and proliferation markers.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

In the subcutaneous xenograft model, treatment with 5-Aza, both alone and in combination with IR, significantly inhibited tumor growth compared to control and IR-only groups. Tumors in the control group grew aggressively, while the 5-Aza treated groups showed notable tumor suppression, and in some cases, tumors were not visible. Histological analysis indicated disorganized cell proliferation in IR-treated tissues, while 5-Aza treatments showed reduced proliferation and signs of cellular damage. Body weight remained stable throughout the study, suggesting

treatments were well-tolerated without significant systemic toxicity.

In the orthotopic xenograft model, BLI results showed a marked reduction in bioluminescent intensity in the 5-Aza treated group, correlating with a reduction in primary tumor burden. This model confirmed the efficacy of the treatment, with no visible macroscopic tumors at the end. The body remained stable, indicating good tolerance and minimal toxicity. Macroscopic examination of lung tissues confirmed tumor reduction without changes in other organs.

The results demonstrated that 5-Aza effectively reduces tumor growth in NSCLC, especially when combined with IR. The treatments did not induce significant systemic toxicity, underscoring the potential of this therapy for clinical application. The orthotopic model validated the clinical relevance of the anti-tumor effects of 5-Aza, and overall, the results support further research to optimize treatment regimens.

4.4 CONCLUSIONS

The study highlighted the therapeutic potential of 5-Aza in NSCLC models, demonstrating significant tumor growth reduction with enhanced efficacy in combination with IR. Treatments were well-tolerated without significant systemic toxicity. Results suggest that 5-Aza may sensitize tumor cells to radiation, allowing for reduced IR doses in clinical practice.

5. GENERAL CONCLUSIONS

This doctoral thesis has made valuable contributions to understanding the etiopathogenetic mechanisms of NSCLC and the therapeutic potential of 5-Aza as an epigenetic agent, both as a monotherapy and in combination with irradiation. Through a series of *in vitro* and *in vivo* studies, complemented by bioinformatics analyses, the research highlighted the synergistic effects of 5-Aza in NSCLC, successfully reactivating tumor suppressor genes and suppressing oncogenic pathways.

A significant result of this work is demonstrated by the combined effect of 5-Aza with irradiation, leading to enhanced inhibition of cell viability, migration, and colony formation. Transcription studies showed that 5-Aza contributes to the genetic reprogramming of cancer cells by activating genes associated with apoptosis, immune response, and tumor suppression.

Our study validated these effects through experiments on xenografted mouse models, both subcutaneous and orthotopic, where significant reductions in tumor growth and metastasis were observed with minimal systemic toxicity. This study explores the combination with IR as a novel approach to enhancing treatment efficacy. In comparison, previous studies have used similar models to evaluate the impact of 5-Aza, demonstrating the versatility of this therapy across different cancer types. This thesis establishes a reference point for NSCLC, applying a dual approach—subcutaneous and orthotopic models—to evaluate the impact of 5-Aza. This comprehensive strategy enabled a detailed understanding of how 5-Aza can modify tumor phenotype and potentiate responses to conventional treatments. In conclusion, this thesis provides a solid foundation for the use of 5-Aza in NSCLC treatment and proposes new personalized therapeutic strategies. The synergy demonstrated between 5-Aza and IR, as well as the identification of potential biomarkers, opens promising prospects for more effective treatments in this type of cancer.

6. ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The data presented in this thesis and the resulting articles represent, to our knowledge, the first comprehensive examination of the interaction between epigenetic modifications, focusing on 5-Aza and IR, in NSCLC. As mechanisms of epigenetic regulation in oncogenesis are elucidated, this research provides critical insights into how these modifications can influence tumor behavior and therapeutic response.

While previous studies have identified various epigenetic alterations in lung cancer, few have rigorously validated the functional implications of these changes, particularly regarding their effects on gene expression and cellular pathways. Our findings illustrate the capacity of 5-Aza to demethylate DNA and reactivate silenced tumor suppressor genes, highlighting the specific cellular processes affected by these alterations. The detailed analysis of how 5-Aza enhances IR treatment efficacy makes a significant contribution to understanding combined therapeutic approaches.