

UNIVERSITATEA BABES – BOLYAI
FACULTATEA DE CHIMIE SI INGINERIE CHIMICA

Controlul posttranscriptional al expresiei genelor
– ARN interferenta in tumorile maligne

Rezumat

Teza de doctorat

Conducator de doctorat:

Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie

Doctorand:

Oana Mihaela Tudoran

Cluj Napoca

- 2011 –

Cuprins

1	INTRODUCERE.....	4
2	OBIECTIVELE TEZEI.....	6
3	MATERIALE ȘI METODE.....	7
3.1	Specimene umane	7
3.2	Culturile celulare.....	7
3.3	Tratamente.....	7
3.4	Analiza moleculară	7
3.4.1	Analiza proteică	7
3.4.2	Analiza mRNA.....	7
3.5	Analiza celulară	8
3.6	Analiza statistică.....	8
4	REZULTATE ȘI DISCUȚII	8
4.1	Expresia factorilor angiogenetici în serul pacienților cu cancer de prostată.....	8
4.1.1	Evaluarea nivelurilor de proteine serice	8
4.1.2	Discuții.....	9
4.2	Evaluarea expresiei factorilor angiogenetici la nivel de mRNA în probele de cancer colorectal..	11
4.2.1	Expresia mRNA în tumorile solide	11
4.2.2	Discuții.....	11
4.3	Evaluarea expresiei factorilor angiogenetici la nivel de mRNA în probele de cancer cervical.....	12
4.3.1	Expresia mRNA în tumorile solide	12
4.3.2	Discuții.....	13
4.4	Evaluarea genomică a paternului molecular indus de siARN VEGFA prin tehnologia microarray și validarea datelor prin PCR.....	14
4.4.1	VEGF siARN inhibă expresia VEGFA în liniile celulare HeLa	14
4.4.2	VEGFA siARN reduce numărul de celule vii	15

4.4.3	VEGFA siARN induce apoptoza în celulele HeLa.....	15
4.4.4	Rezultatele microarray.....	16
4.4.5	Inhibiția VEGFA modulează genele implicate în procesul angiogenic.....	17
4.4.6	VEGFA siARN duce la supraexprimarea unor gene implicate în căile de semnalizare apoptotice intinsece și extrinsece.....	18
4.4.7	Corelarea datelor PCR array cu cele microarray.....	19
4.4.8	Apoptoza indusă de VEGFA siARN este independentă de p53.....	19
4.4.9	Discuții.....	20
4.5	Mecanismul transcripțional al angiogenezei și al apoptozei induse prin EGCG în celulele tumorale cervicale	23
4.5.1	Efectul EGCG asupra potențialul angiogenic al celulelor HeLa.....	23
4.5.2	Effectul EGCG în potențialul apoptotic al celulelor HeLa	25
4.5.3	Efectul EGCG în proliferarea celulelor HeLa.....	26
4.5.4	Efectul EGCG asupra atașamentului și imprăștierii celulare	26
4.5.5	Atașarea la endoteliu	27
4.5.6	Inhibiția migrației celulare prin EGCG	28
4.5.7	Discuții.....	28
5	CONCLUZII	31
6	REFERENCES.....	34

Keywords: cancer, angiogeneză, apoptoză, ARN interferență, microarray, mecanism molecular

1 INTRODUCERE

La nivel mondial, unul din opt oameni mor de cancer, această boală este prima cauza de deces în țările dezvoltate, iar al doilea în țările în curs de dezvoltare (după bolile de inimă). În 2008, au fost 12.7 milioane noi cazuri diagnosticate cu cancer, dintre care 7.6 milioane decese (aproximativ 21000 de decese pe zi) iar până în 2030, sunt preconizate 21,4 milioane de noi cazuri și 13,2 milioane decese [1]. Statisticile sunt îngrijorătoare, și, deși mult efort a fost pus în cercetarea acestor boli oribile, încă ne lipsește "glontul magic".

Prin definiție, cancerul este "un grup de boli caracterizate prin creșterea și răspândirea necontrolată a celulelor anormale, și dacă nu sunt controlate, acestea pot duce la deces" [1]. Cancerul se dezvoltă în mai multe etape, pe o perioadă lungă de timp. Atât factori genetici (mutații moștenite sau achiziționate, condițiile imunitare, etc) cât și de mediu (tutun, produse chimice, radiații, organismelor infectioase, etc) s-au dovedit a promova carcinogeneza, fie acționând împreună sau în secvență. Până în prezent, nu sunt tratamente pentru cancer, deși anumite tipuri de cancer pot fi prevenite prin minimizarea expunerii la factori cancerigeni, sau unele boli potențial maligne pot fi detectate în stadiu incipient, atunci când acestea pot fi tratate.

Cancerul este o boală antică, fiind descrisă pentru prima dată de Hipocrates. În 1971, Statele Unite ale Americii a declarat "război" împotriva cancerului, aducând cercetarea în domeniul cancerului în prim plan. De atunci, importante progrese s-au făcut în înțelegerea acestor patologii. Prin compararea celulelor normale cu cele canceroase, a fost posibilă elucidarea, într-o anumită măsură, a ceea ce se întâmplă în cancer. Organismul este constituit din o mulțime de tipuri de celule, teoretic, fiecare celulă având potențialul de a dezvolta una sau mai multe tipuri de cancer. Au fost descrise peste 1.000 de dereglări diferite în funcțiile celulelor normale și țesuturi, dar în cea mai mare parte, cancerul se caracterizează printr-o creștere anormală a celulelor. În celulele sănătoase, diviziunea celulară este strict reglementată, celulele trebuie să treacă mai multe puncte de control pentru a putea progresa în ciclul celular. Dacă celulele sunt deteriorate fără posibilitatea de a fi reparate, acestea sunt marcate pentru moartea programată, un proces cunoscut sub numele de apoptoză. Celulele canceroase scapă de aceste

puncte de control, încep să se dividă incontrolabil formând tumori. Creșterea tumorală este limitată de numărul vaselor de sânge disponibile la locul tumoral care să transporte nutrienții și oxigenul, absolut esențiale pentru supraviețuirea celulară. În lipsa unui sistem vascular adecvat, celulele tumorale își generează propria vasculatură din cea preexistentă, un proces numit angiogeneză tumorală. Celulele tumorale devin invazive și se răspândesc în tot corpul prin intermediul vaselor de sânge nou formate. În consecință, funcțiile normale ale țesuturilor și organelor sunt întrerupte, ceea ce duce în cele din urmă la moarte.

Deci, dezvoltarea și progresia cancerului presupune dobândirea de către celule tumorale al unui profil genetic specific, care să permită supraviețuirea, proliferarea, neoangiogeneza, invazia și metastazarea celulelor tumorale. Identificarea și descrierea mecanismelor implicate în dobândirea fenotipului malign, este esențială în dezvoltarea terapiei anticancer.

Există câteva tipuri de cancer ce pot fi prevenite și, dacă detectate devreme acestea sunt, în general, curabile. Există patru tratamente principale pentru cancer: chirurgia, chimioterapia, radioterapia și terapia țintită. Chirurgia este de obicei, efektivă pentru tumori localizate cu scopul de a elimina cât mai mult țesut posibil. Aceasta a fost tratamentul cel mai practicat până când a fost introdusă radioterapia. Radioterapia presupune utilizarea de radiații ionizante care induc ruperea ADN-ului, ceea ce face imposibilă diviziunea celulelor. Chimioterapia folosește medicamente care vizează celulele cu o rată mare de multiplicare. Aceste tipuri de tratament provoacă reacții adverse grave, datorită faptului că nu doar celulele canceroase au o rată ridicată de multiplicare în organism. Terapia țintită utilizează medicamente care vizează celulele canceroase în mod specific, acest tip de terapie fiind în continuă dezvoltare. Cu toate acestea, deși aceste terapii înregistrează succese în tratamentul stadiilor incipiente ale cancerului, în tratarea cancerelor metastatice sau recurente sunt slab eficiente și cu efecte adverse serioase. Există o mare nevoie de a identifica și investiga noi agenți sistemici pentru tratamentul cancerului.

Terapia genică este una dintre cele mai interesante subiecte ale medicinei moleculare. Descoperirea recentă a interferenței ARN (ARNi) a inițiat dezvoltarea unui nou domeniu de cercetare cu scopul de a elabora o tehnică terapeutică, bazată pe inhibarea specifică a genelor implicate în diferite patologii. Identificarea genelor țintă și a mecanismelor induse prin inhibarea acestora sunt esențiale pentru a pune bazele unui tratament cu ARNi. Aplicabilitatea și specificitatea mecanismului de angiogeneză tumorală face posibilă elaborarea unei tehnici

terapeutice fără afectarea celulelor sănătoase. Astfel, controlul posttranscripțional al angiogenezei tumorale reprezintă o abordare promițătoare în tratamentul la nivel molecular al cancerului.

2 OBIECTIVELE TEZEI

1. Evaluarea la nivel tisular și seric a unui panel de molecule pro și anti angiogenice în cancerul de prostată, colorectal și cervical, pentru identificarea implicării acestora în progresia cancerului.
2. Corelarea acestor molecule cu diagnosticul și prognosticul clinic.
3. Investigarea mecanismului molecular al VEGFA în progresia cancerului pentru identificarea acestei gene ca și posibilă țintă terapeutică.
4. Evaluarea mecanismului molecular și celular indus prin tratamentul cu EGCG în vederea utilizării acestui compus ca și tratament anti-angiogenic multi specific.

3 MATERIALE ȘI METODE

3.1 Specimene umane

Au fost investigate trei patologii pentru expresia factorilor angiogenetici: cancerul de prostata, colorectal și cervical. Au fost colectate probe de ser de la 34 de pacienți cu afecțiuni de prostată și șase pacienți considerați în grupul de control. Au fost colectate probe de biopsie de la 33 de pacienți operați de cancer colorectal și 44 cu carcinom cervical și 10 femei cu cervix normal, ca și control.

3.2 Culturile celulare

Au fost utilizate celule HeLa și HUVEC (ECACC) pentru investigarea efectelor tratamentului.

3.3 Tratamente

Tratamentul cu siARN: celulele HeLa au fost transfectate în mediu Opri-Mem fără ser cu agent de transfecție siPort NeoFx (Ambion) și siARN conform specificațiilor producătorului. Ca și control s-au folosit celule netransfectate, mock (doar agent de transfecție) sau celule transfectate cu siARN nespecific (control Silencer Negative siARN #1, Ambion).

Tratamentul cu EGCG: celulele HeLa au fost crescute în mediu Opti-Med (Gibco) și tratate cu EGCG (Sigma-Aldrich) pentru 24 și 48 de ore. Celulele de control au fost tratate cu PBS în locul EGCG.

3.4 Analiza moleculară

3.4.1 Analiza proteică

Nivelele de expresie ale proteinelor de interes au fost analizate cu **ELISA**, **western blot** sau tehnologia **FastQuant**. Aceste metode permit cuantificarea proteinelor din orice fluid biologic folosind afinitatea antigen-anticorp.

3.4.2 Analiza mARN

Nivelele de expresie mARN au fost analizate utilizând **Real-Time PCR**, **PCR array** și **microarray**. ARN-ul total a fost izolat cu TriReagent (Sigma-Aldrich), purificat cu RNAeasy Mini Kit (Qiagen) și apoi analizat pentru calitate și cantitate cu ND-1000 și Agilent Lab-on-a-

chip Bioanalyzer (tehnologia Agilent). Doar probele care prezentau un RIN cuprins între 9 și 10 au fost folosite mai departe în analiză. În funcție de metoda folosită, ARN-ul a fost fie transcris în cADN și amplificat sau marcat și hibridizat pe lame microarray. Analiza datelor a fost făcută prin compararea grupului de interes cu cel de control.

3.5 Analiza celulară

Proliferarea celulară a fost evaluată folosind **testul MTT**. Apoptoza celulară a fost măsurată folosind **on-chip flow cytometry**. Efectele privind adeziunea celulară au fost cuantificate folosind metode de determinare a **atașării, adeziunii și împrăștierei** celulare. Invazivitatea a fost măsurată prin utilizarea metodei **de invazie *in vitro***.

3.6 Analiza statistică

Toate experimentele au fost efectuate cel puțin în triplicat. Toate datele au fost prezentate ca medie \pm eroarea standard a mediei (SEM). Diferențele au fost evaluate prin testul t folosind programul de statistică, SPSS11.0 pentru Windows. $P < 0.05$ a fost considerat ca fiind statistic semnificativ.

4 REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1 Expresia factorilor angiogenetici în serul pacienților cu cancer de prostată

4.1.1 Evaluarea nivelelor de proteine serice

Probele de ser au fost analizate pentru prezența a opt factori implicați în angiogeneză (PDGFBB, VEGF, bFGF, angiogenina, KGF, TIMP-1, ICAM-1 și ANG-2). Testul Shapiro-Wilk a fost folosit pentru a examina normalitatea valorilor. ANG2, KGF, PDGF-BB și TIMP-1 au avut distribuții normale ($p > 0.05$). Valorile Angiogeninei, ICAM-1 și VEGF au fost supraexprimate, și nu s-a putut aplica testul de normalitate. bFGF a fost subexprimat în majoritatea probelor, de asemenea nu s-a putut aplica testul de normalitate. Diferențe semnificative au fost găsite pentru KGF: PCa vs. BPH ($p = 0.022$) și PCa vs. CP ($p = 0.050$); pentru ANG2: control vs. BPH ($p = 0.038$) și control vs. CP ($p = 0.037$); pentru PDGF-BB: control vs. CP ($p = 0.008$). Rezultatele au arătat că sunt diferite semnificative de concentrație în ser între Pca, BPH, CP și grupurile de control pentru următoarele molecule angiogenice: KGF,

ANG2, PDFG-BB și TIMP-1 (Fig.1). Nivelele KGF au fost mai ridicate în BPH și CP decât în PCa; ANG2 a fost mai scăzut în BPH și CP decât în grupul de control; PDFG-BB a fost mai ridicat în BPH decât în grupul de control; și TIMP-1 a fost mai scăzut în PCa, BPH și CP în comparație cu grupul de control.

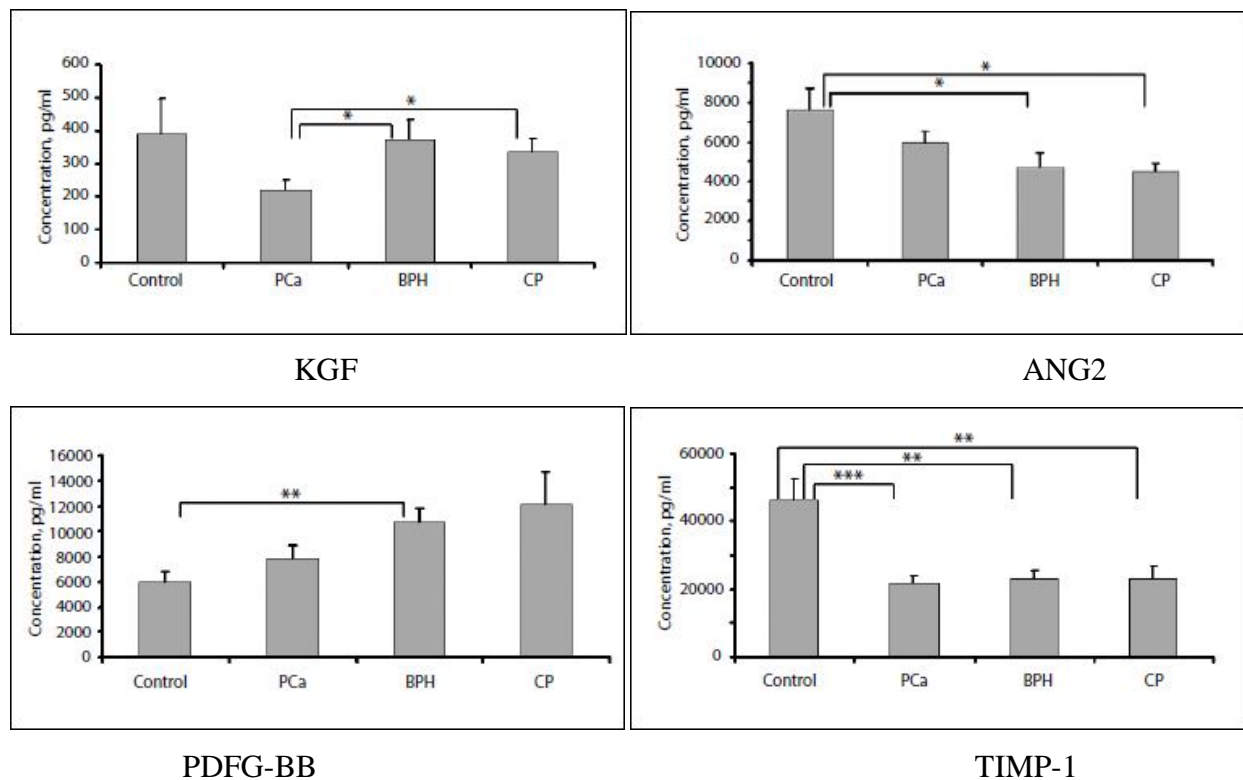


Fig. 1 Concentrațiile medii ale grupului de control, PCa, BPH și CP (Eroarea standard a mediei, * $p < 0.05$).

4.1.2 Discuții

În acest studiu, am reușit evaluarea simultană a 4 molecule angiogenice (KGF, ANG2, PDFG-BB and TIMP-1) în serul prelevat de la 40 pacienți cu afecțiuni ale prostatei (PCa, BPH, CP) utilizând tehnologia multiplex FAST Quant®. Rezultatele arată diferențe statistic semnificativ scăzute pentru molecula KGF în PCa (218.96 pg/ml) comparativ cu BPH (371.28 pg/ml) și CP (334.68 pg/ml). KGF este un factor de creștere stromal, important în medierea activităților induse de androgen în BPH și PCa. Acest studiu este în concordanță cu cel publicat de Metha et al. [2], care au găsit de asemenea nivele mai ridicate de KGF în BPH decât în PCa. În prostata sănătoasă, KGF, cunoscut ca și FGF-7, este un factor de creștere paracrin care este sintetizat în celulele stromale sănătoase cu efect asupra celulelor epiteliale prin intermediul receptorilor specifici. Huang et al. [3] au demonstrat că KGF are efecte mitogenice și anti-

apoptotice care sunt corelate cu inducerea expresiei de ciclină-D1, Bcl-2, Bcl-xL și fosfo-Akt în linii celulare de cancer de prostată. ANG2, o altă moleculă pro-angiogenică a fost identificată ca având valori statistic semnificativ scăzute în BPH (4,728.05 pg/ml) și CP (4,512.80 pg/ml) comparativ cu grupul control (7,632.25 pg/ml). ANG1 și ANG2 sunt principalii reglatori ai creșterii și regresiei vasculare, deși în patologia prostatei, rolul angiopietinelor nu este cunoscut [4]. ANG2 are proprietăți anti-angiogenice [5], prin inhibarea abilității de remodelare vasculară indusă de ANG1 și poate induce apoptoza celulelor endoteliale [6]. Valori anormale ale ANG1, ANG2 și a receptorilor acestora, Tie-2, au fost indicate în PCa, iar relațiile dintre acestea pot fi importante în managementul angiogenezei [7, 8].

Am identificat valori mai scăzute ale moleculei TIMP-1 în BPH (22,984.35 pg/ml), CP (22,891.10 pg/ml) și PCa (21,832.70 pg/ml), comparativ cu grupul control (46,172.24 pg/ml). Balanța dintre MMP și inhibitorii naturali ai acestora, TIMP, pare să fie importantă pentru progresia și metastazarea tumorală. TIMP inhibă angiogeneza prin legarea directă a MMP și inhibarea activității acestora, blocând proliferarea celulară și inducând subexpresia genei VEGF [9]. În PCa, există o dereglare a acestei balanțe dintre MMP și TIMP, cu o pierdere semnificativă a TIMP-1 [10-12]. TIMP-1 are un rol multifuncțional în tumorigeneza prostatei, incluzând inhibarea activității catalitice a MMP, promovarea creșterii, inhibarea apoptozei și reglarea angiogenezei. Studiile au arătat că TIMP și inhibitorii sintetici ai MMP inhibă tubulogeneza și invazia celulelor endoteliale în Matrigel și matrici de tip I. Printre MMP care sunt specific implicate în angiogeneză, 2 gelatinaze, MMP-2 și -9 și MMP membranar sunt inhibate de TIMP-1 [13-15]. Includerea TIMP-1 în panelul de biomarkeri serici va duce la o mai bună înțelegere a rolului acestei molecule în evoluția PCa. Concentrația moleculei PDGF-BB în ser este dublă în BPH (10,800.66 pg/ml) față de cea în grupul control (5,988.72 pg/ml). Pe baza acestor rezultate, PDGF-BB poate fi utilizată pentru diferențierea între CP și BPH, amândouă patologii fiind caracterizate prin nivele mai scăzute de ANG2 și TIMP-1 decât grupul control. PDGF funcționează ca și un “factor de competență” care induce un set de gene implicate în răspunsul timpuriu care se exprimă în faza G1 a ciclului celular, inclusiv p21WAF1/CIP1 un mediator funcțional al genei supresoare de tumora p53 în punctul de control G1/S al ciclului celular [16].

4.2 Evaluarea expresiei factorilor angiogenici la nivel de mRNA în probele de cancer colorectal

4.2.1 Expresia mRNA în tumorile solide

Rezultatele noastre au arătat nivele VEGF ridicate în toate stadiile, dar fără diferențe semnificative. Nivelele bFGF și PDGF-BB au fost semnificativ mai ridicate în stadiul B vs. C.

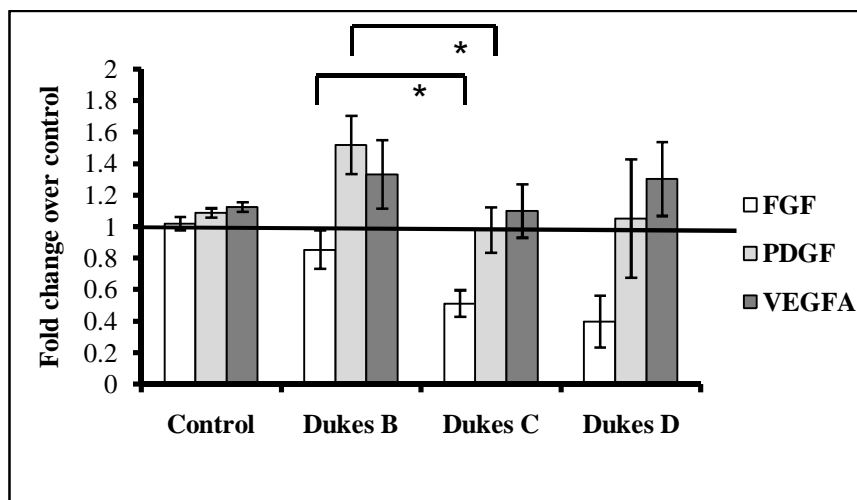


Fig. 2 Nivele de expresie în diferite stadia tumorale

4.2.2 Discuții

Studiile au arătat că VEGF este o moleculă cheie în tumorigeneza colonului, supraexpresia acesteia fiind asociată cu prognoze slabe [17]. În ultimii ani, înțelegerea biologiei tumorale a dus la dezvoltarea unor terapii, de exemplu bevacizumab care țintesc VEGF. Acest tratament a fost aprobat în terapia cancerului colorectal metastatic începând cu 2004 [18]. Studiul nostru arată valori ridicate ale nivelului de VEGF chiar și în tumori în stadii B, indicând implicarea timpurie a acestui factor de creștere în dezvoltarea CRC, justificând astfel numărul ridicat de studii cu bevacizumab în tratamentul adjuvant al cancerului de colon. bFGF și receptorii acestuia sunt implicați în diferite funcții biologice, incluzând proliferare celulară, diferențiere, migrare și supraviețuire. În CRC, bFGF a fost identificat ca și supraexprimat, fiind astfel considerat o posibilă țintă terapeutică [19]. Nivelul mai ridicat al bFGF în stadiul Dukes B comparativ cu Dukes C și D poate fi explicat prin implicarea timpurie a acestui factor în

carcinogeneza colorectală. Rezultatele sunt în concordanță cu cele raportate de Tassi et al. în 2006, care propunea evaluarea bFGF la nivel seric ca și metodă de screening pentru detectarea timpurie a leziunilor premaligne ale colonului [20].

Rolul PDGF în angiogeneza tumorală a fost demonstrat în diferite studii, supraexprimarea acestui factor fiind corelată cu densitatea microvasculară și supraviețuire redusă [21]. Rezultatele privind implicarea PDGF în carcinogeneza colorectală nu sunt conclusive, nivelele ridicate ale PDGF în Dukes B comparativ cu Dukes C sau D sunt în concordanță cu cele obținute de alți autori, sugerând de asemenea o implicare timpurie a PDGF în dezvoltarea acestui tip de cancer [22]. Prin evaluarea nivelelor de expresie a PDGF-BB, VEGF și bFGF în diferite stadii de dezvoltare a CRC, acest studiu aduce noi informații privind căile moleculare implicate în carcinogeneza colorectală.

4.3 Evaluarea expresiei factorilor angiogenici la nivel de mARN în probele de cancer cervical

4.3.1 Expresia mARN în tumorile solide

Nivelele de expresie mARN pentru VEGFA și VEGFR2 au fost analizate la biopsiile pacienților cu cancer cervical. Analiza transcriptomică a arătat nivele ridicate de mARN VEGFA în stadiul II și III ale evoluției tumorale, dar fără semnificație statistică (Fig. 3). Mai mult, nivelele VEGFA par să scadă cu stadiul tumoral, indicând faptul că odată ce angiogeneza este stabilită, semnalizarea factorului de creștere nu mai este necesară. Pentru VEGFR2 am găsit nivele scăzute de mARN în probele tumorale comparativ cu cele de control, cu semnificație statistică pentru ambele stadii. Cu toate acestea, nu s-a găsit nicio diferență în expresia VEGFR2 între stadiile II și III, ceea ce sugerează că expresia receptorului nu este implicată în evoluția tumorală.

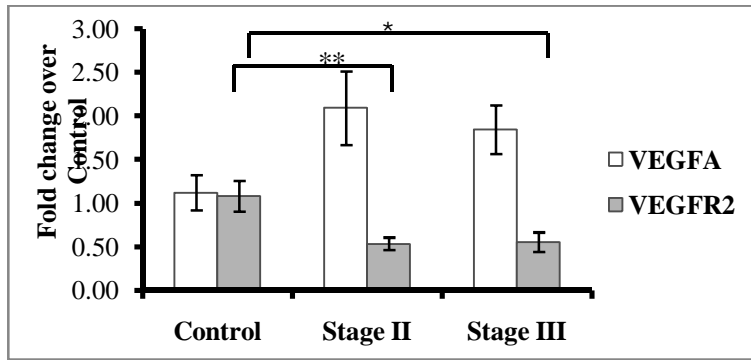


Fig. 3 Expresia nivelelor mRNA conform stadiului tumoral

Analizând corelarea dintre diferiți factori prognostici clinici, biomarkeri și răspunsul tumoral, au fost obținute valori statistice semnificative pentru dimensiunea tumorii la diagnostic ($p=0.01$) și expresia VEGFR2 ($p=0.02$). Analizând rezultatele pentru factorii angiogenici, răspuns complet a fost observat la pacientele cu un nivel ridicat de VEGFR2 (Fig. 4), valoarea de interes a curbei ROC fiind 0.54 unități ($p=0.02$, Fig. 5).

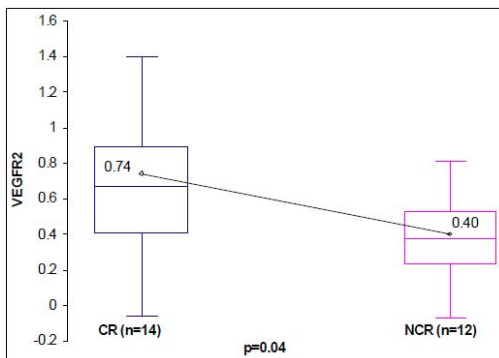


Fig. 4 Răspunsul tumoral vs. VEGFR2

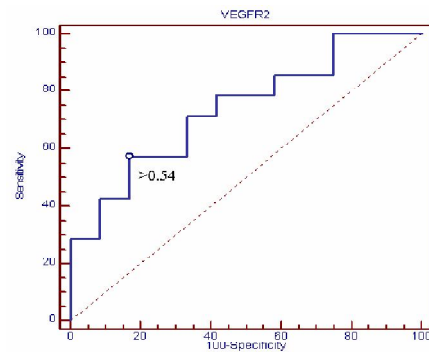


Fig. 5 Curba ROC pentru VEGFR2

4.3.2 Discuții

VEGFA este un factor de creștere secretat de celulele tumorale și promovează angiogeneza tumorală prin stimularea proliferării celulelor endoteliale, supraviețuirea și migrarea acestora la locul tumoral. Nivele ridicate de VEGFA au fost evidențiate în paciente cu cancer cervical comparabil cu țesut normal [23, 24], și au fost corelate cu stadii avansate și supraviețuire redusă [25]. Deși în acest studiu, expresia VEGF nu se corelează cu stadiul tumoral, supraviețuire sau răspuns la terapie, am observat nivele ridicate de expresie în ambele stadii investigate, comparativ cu grupul control.

Inițial, se presupunea că VEGFA acționează printr-un mecanism paracrin [26], studii recente au arătat de asemenea un efect autocrin care promovează supraviețuirea tumorală, migrarea și invazia tumorală [27-30].

Receptorul VEGFR 2 este exprimat aproape exclusiv în celulele endoteliale, dar studii recente au arătat ca VEGFR2 este distribuit atât în țesuturi cât și în tumori [31], sugerând un mecanism autocrin de semnalizare prin axa VEGFA/VEGFR2 [31-33]. Studiul de literatură a identificat un singur raport referitor la expresia VEGFR2 în carcinomul adenocarcinom cervical, supraexpresia acestuia fiind asociată cu lipsa metastazelor, dar nu s-a găsit nici o corelație cu supraviețuirea sau răspunsul la terapie [34]. Autorii sugerează că în acest tip de tumori, metastazarea se face prin alte molecule de semnalizare. Un alt studiu care a investigat nivelele VEGFR2 solubil în serul pacienților cu cancer cervical au observat nivele mai ridicate la pacientele cu cancer recurent comparativ cu pre-invaziv și primar invaziv [35]. Rezultatele noastre arată ca nivelul VEGFR2 este mai mare în pacientele cu răspuns clinic complet la sfârșitul tratamentului, deci nivelul pre-terapeutic al VEGFR2 ar putea fi utilizat ca și factor predictiv la tratamentul tumorilor cervicale.

4.4 Evaluarea genomică a paternului molecular indus de siARN VEGFA prin tehnologia microarray și validarea datelor prin PCR

4.4.1 VEGF siARN inhibă expresia VEGFA în liniile celulare HeLa

VEGFA siARN a fost transfectat în celulele HeLa și supernatantul a fost testat prin FastQuant array pentru nivelele de proteina VEGFA secretate. Celulele netransfectate și cele tratate mock au fost utilizate ca și control. Celulele transfectate VEGFA siARN au arătat o scădere cu 35% în proteina VEGFA secretată în comparație cu celulele de control (Fig. 6) după doar 24 de ore de tratament. Aceste rezultate demonstrează reducerea proteinei VEGFA la nivelul mRNA.

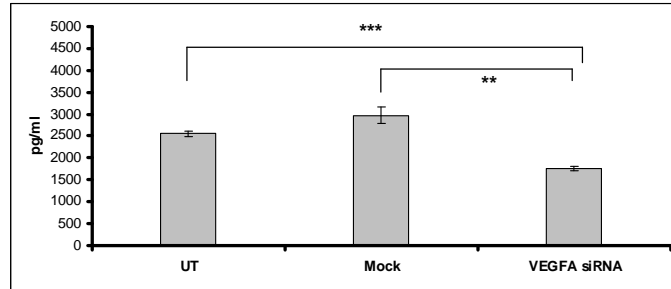


Fig. 6 Efectul VEGFA siRNA asupra secreției proteice

4.4.2 VEGFA siARN reduce numărul de celule vii

Am investigat citotoxicitatea tratamentului siARN și impactul inhibiției VEGFA asupra ratei de proliferare celulară prin metoda MTT. Rezultatele noastre arată că inhibiția VEGFA induce o reducere a numărului de celule vii cu 40% după 24 de ore de tratament fără a observa toxicitate a tratamentului (celulele netransfectate fiind comparate cu celulele tratate cu control negativ). Cu toate acestea, după 48 de ore de tratament s-a observat o scădere a numărului de celule vii în grupul tratat cu siARN nespecific în comparație cu celulele netransfectate indicând toxicitate. Un procent mai mare de celule vii a fost găsit în grupul tratat cu VEGFA siARN spre deosebire de grupul control negativ (Fig. 7).

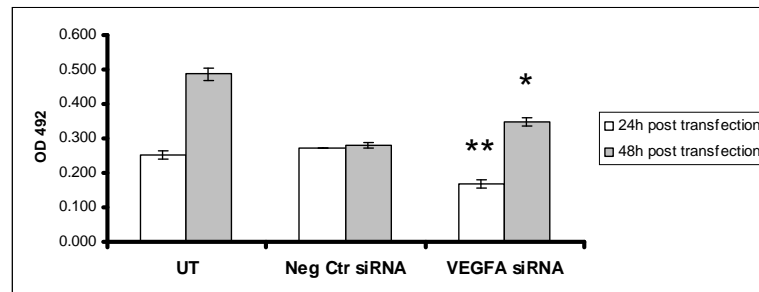


Fig. 7 Efectul VEGFA siRNA asupra proliferării celulare

4.4.3 VEGFA siARN induce apoptoza în celulele Hela

Citometria de flux în cip a fost utilizată pentru evaluarea efectului apoptotic al inhibiției VEGFA. Tratamentul VEGFA siARN a indus nivele semnificative de apoptoză în funcție de timpul de tratament (Fig. 8). Am observat celule apoptotice în grupul de control negativ după 48 de ore de la transfecție, ceea ce indică o toxicitate a tratamentului.

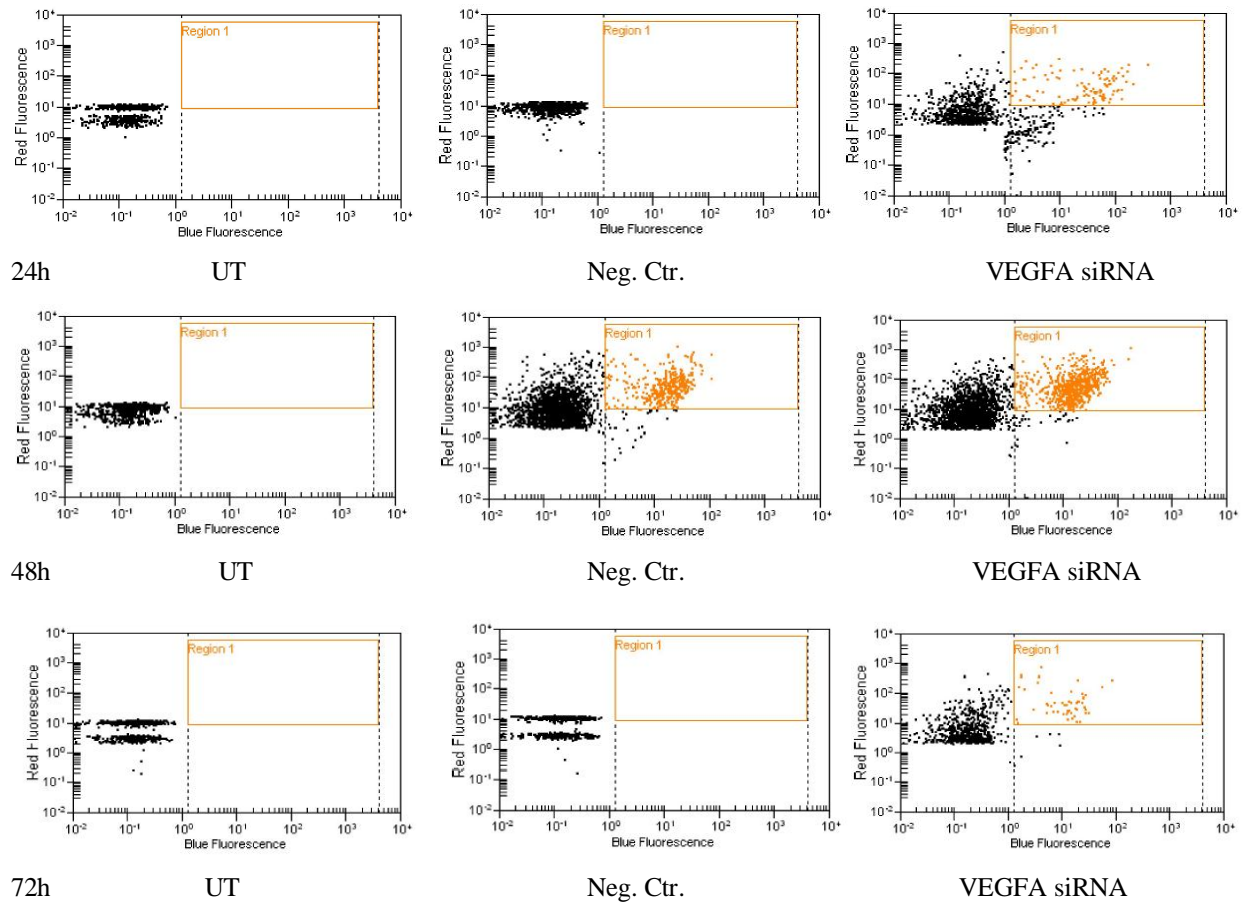


Fig. 8 Analiza apoptozei celulare. 24, 48 și 72 de ore după transfecție celulele au fost colectate, marcate cu Anexină V și calceină și au fost analizate prin citometrie de flux în cip cu Agilent Bioanalyzer.

4.4.4 Rezultatele microarray

Datele microarray au fost integrate în softul GeneSpring, filtrate la nivel de expresie mai mare de 2.0, supuse testului t și analizate. Analiza a arătat că inhibiția VEGFA a dus la sub sau supra exprimarea a 480 gene din care 88 au fost supraexprimate iar 392 au fost subexprimate (Fig. 9)

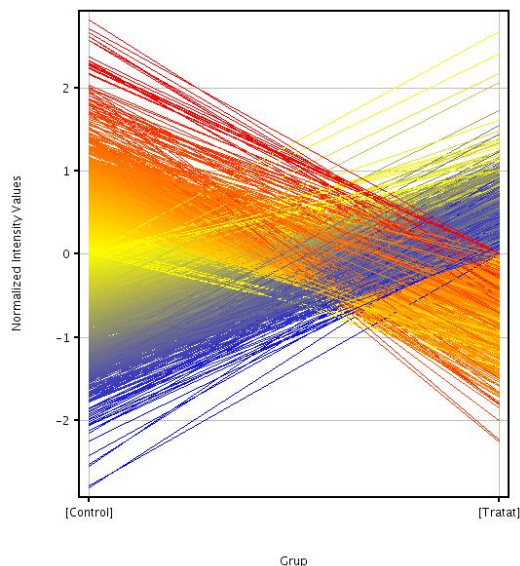


Fig. 9 Distribuția genelor analizate (GeneSpring): roșu – gene supraexprimate, galben – gene cu același nivel de expresie, albastru – gene subexprimate

4.4.5 Inhibiția VEGFA modulează genele implicate în procesul angiogenic

Toate celulele au fost cultivate în condiții similare și supuse transfecției cu VEGFA siARN. Celulele tratate (VEGFA siARN) au fost evaluate prin qRT-PCR folosind amorse și probe pentru toți cei 7 transcripti ai VEGF la intervale de timp diferite: 24, 48 și respectiv 72 de ore. Inhibiția maximă a VEGF a fost la 24 de ore, inhibiția reprezentând 70% din expresie.

Analiza PCR Array a fost efectuată pentru celule tratate pentru 24 de ore cu siVEGF comparativ cu cele netratate. Kit-ului prevede evaluarea simultană a expresiei a 84 de gene cheie implicate în modularea procesului de angiogeneză. Lama include factori de creștere și receptorii lor, chemochine și citochine, molecule de matrice și adeziune, proteaze și inhibitorii lor, factori de transcripție. Human Angiogenesis RT² PCR Array a arătat ca inhibiția VEGFA a dereglat 13 gene dintr-un total de 84 de gene implicate în angiogeneză, din care 10 au fost supraexprimate iar 3 subexprimate, conform Tabel 1.

Tabel 1. Gene exprimate diferit la 24 ore dupa tratamentul cu VEGFA siARN versus grupul netratat

Gene	Fold regulation
Angiopoietin 2 (ANGPT2)	2.4726
Hepatocyte growth factor (HGF)	2.323
Heparanase (HPSE)	2.3883
Inhibitor of DNA binding 1(ID1)	2.4217
Inhibitor of DNA binding 3 (ID3)	2.4385
Interleukin 1, beta (IL1B)	2.4385
Laminin, alpha 5 (LAMA5)	2.4897
Plasminogen (PLG)	2.0083
TEK tyrosine kinase, endothelial (TEK)	2.5245
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 (TNFAIP2)	2.2595
Thymidine phosphorylase (TYMP)	-2.45218
Sphingosine kinase 1 (SPHK1)	-2.07641
Stabilin 1 (STAB1)	-3.10366

4.4.6 VEGFA siARN duce la supraexprimarea unor gene implicate în căile de semnalizare apoptotice intinsece și extrinsece

ARN-ul extras din celulele tratate și netratate a fost analizat pentru expresia a 84 de gene cunoscute ca fiind implicate în reglarea procesului apoptotic și în moartea celulară programată. Placa include liganzi TNF și receptorii lor, membrii ai bcl-2, caspase, IAP, TRAF, CARD, "death domain", "death effector domain" si familii CIDE, precum și gene implicate în caile de semnalizare p53 și ATM.

Tabel 2 Gene exprimate diferit la 24 de ore dupa tratamentul siARN VEGFA vs. celule netratate.

Gene	Fold regulation
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1)	1.26
BCL2-antagonist/killer 1 (BAK1)	1.26
baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC 3)	-1.31
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a (TNFRSF10A)	1.42
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B)	1.25
Tumor protein 73 (TP73)	2.38

Cinci gene housekeeping (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH și ACTB) au fost folosite pentru normalizarea între godeuri. Analiza datelor a fost efectuată prin metoda $\Delta\Delta C_t$ folosind

Superarray Data Analysis Web Portal. Au fost considerate semnificative toate genele cu un nivel de expresie cuprins între -1.25 și 1.25 pentru a evalua genele implicate în procesul de apoptoză timpurie. Șase gene din totalul de 84 au fost identificate ca fiind semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0.05$). Cinci gene sunt supraexprimate, iar una subexprimată (Tabel 2).

4.4.7 Corelarea datelor PCR array cu cele microarray

Conform datelor PCR array câteva gene de interes au validat experimentul microarray (Tabel 3). S-au identificat gene care aveau aceeași reglare (VEGF, ID3, TEK, STAB1, BIRC 3) în ambele experimente, cât și unele ca sunt inversate (AKT1, BAK1, TP73) în experimentul PCR array.

Analiza microarray este o metodă semicantitativă și necesită validarea datelor utilizând tehnologia PCR. Rezultatele PCR indica faptul că unele gene ce sunt implicate în inducerea apoptotică sunt supraexprimate, contrar datelor microarray. Din moment de s-a observat o creștere a numărului de celule apoptotice, rezultatele noastre sunt corelate cu genele validate de PCR.

Tabel 3. Gene identificate în experimentul microarray validate utilizând tehnologia PCR array

Fold change	Regulation	Gene
1.58	down	vascular endothelial growth factor B (VEGFB)
1.69	down	vascular endothelial growth factor C (VEGFC)
1.93	up	TEK tyrosine kinase (TEK)
4.01	up	inhibitor of DNA binding 3 (ID3)
1.49	down	stabilin 1 (STAB1)
1.70	down	serpin peptidase inhibitor (SERPINF1)
1.93	down	transforming growth factor (TGF)
1.77	down	fibroblast growth factor receptor 1 (FGF1)
3.70	down	baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3)

4.4.8 Apoptoza indusă de VEGFA siARN este independentă de p53

Pentru a evalua implicarea proteinei 53 în apoptoza indusă de VEGFA siARN s-au cuantificat nivelele de expresie a acestei proteine prin analiza western blot. Cantități egale de proteine din grupul control și din probele tratate cu VEGFA siARN au fost analizare prin

imunoblotare cu anticorpi pentru p53, GAPDH (Fig. 10). Analiza densitometrică a arătat ca în celulele HeLa semnalul pentru p53 a fost constant în probele tratate cu VEGF siARN în comparație cu controlul negativ.

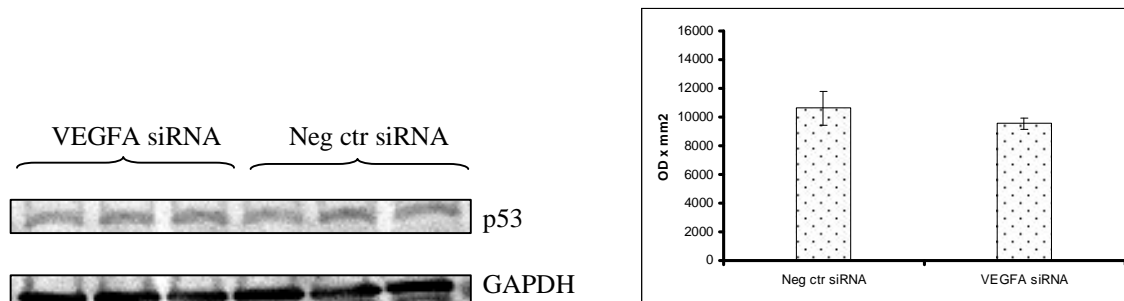


Fig. 10 Nivele de expresie ale proteinei p53

4.4.9 Discuții

Scopul acestui studiu a fost determinarea mecanismului de acțiune a genei VEGFA în celule tumorale cervicale *in vitro*. Mecanismul de ARN interferență a fost utilizat ca si terapie antiangiogenică, datorită abilității de a ținti specific gene la nivel postranscripțional.

VEGFA este secretat de majoritatea tumorilor și, prin interacția cu receptorul VEGFR2 exprimat atât în celulele endoteliale cât și tumorale, stimulează creșterea tumorală fie printr-un mecanism paracrin asupra celulelor endoteliale, fie printr-un mecanism autocrin asupra celurilor tumorale.

Utilizând siARN împotriva genei VEGFA, am indus subexprimarea atât a transcriptului cât și a proteinei VEGFA. Inhibiția genei VEGFA a dus la reducerea ratei de proliferare celulară și declanșarea apoptozei, sugerând că VEGFA joacă un rol critic în supraviețuirea celulelor tumorale cervicale. Rezultatele arată că VEGFA este implicat în apoptoza celulelor tumorale cervicale, dar și o moleculă importantă în creșterea tumorală.

Rezultatele demonstrează de asemenea că VEGFA este un modulator important al mecanismului de angiogeneza. Faptul că inhibiția maximă a genei VEGFA a fost observată după 24 de ore, confirmă aspectele clinice ale terapiei antiangiogenic care trebuie administrată în mod continuu. Mai mult, refacerea potențialului proangiogenic al VEGF în mai puțin de 72 de ore ajută la înțelegerea multiplelor căi care reglementează dobândirea și conservarea potențialului malign. Inhibarea genei VEGF prin ARN interferență ar putea fi combinată cu inhibarea altor gene implicate în angiogeneza, în scopul de a obține o inhibiție mai bună a potențialului

angiogenic. Nivelele de VEGF165, VEGF189, VEGF206 sunt crescute în multe tumori maligne umane, inclusiv de san, plamâni, creier, pancreas, ovar, rinichi, vezica urinara. Studiile care au folosit diferiti agenti pentru a bloca caile de semnalizare VEGF/VEGFR, au aratat reducerea proliferarii și invazia celulelor endoteliale și angiogeneza, în general. Din cunostintele noastre, nu există studii privind efectele inhibiției genei VEGF asupra celulelor cancerului de col. In mod surprinzator, studiul nostru a arătat că inhibarea VEGFA a dus la supraexprimarea a 10 gene proangiogenice și inhibarea a 3 (Tabel 2).

Inhibarea genei VEGF a dus la activarea unor alte căi importante pentru mecanismul de angiogeneza, cum ar fi factor de crestere ANGPT2, care este implicat în stimularea invaziei celulare. ID1 și ID3 care sunt ambii factori de transcripție și subexprima trombospondina sunt supraexprimati. HPSE (heparanaza) este un endo-beta-D-glucuronidaza care scindează HPSG (proteoglicani heparan sulfat), expresia acesteia a fost stimulată de inhibiția VEGF, expresia acesteia fiind asociată cu metastaze tumorale și angiogeneza. Interacțiunea FGF/HPSG este inhibată în studiul nostru, în plus subexprimarea FGFR3 sugerează că și formarea complex este inhibată, precum și prezentarea FGF la receptorii tirozin kinazici. Rezultatele noastre confirmă faptul că există mai multe mecanisme care implică factori pro și anti-angiogenici, precum și necesitatea de a căuta metode de țintire multilaterală pentru a inhiba procesul de angiogeneza.

De asemenea am investigat mecanismul de apoptoza indus prin inhibarea genei VEGFA prin evaluarea nivelelor de expresie a 84 de gene implicate în acest proces. Analiza transcriptomică arată că procesul de apoptoza este inițiat de gene implicate în ambele căi de semnalizare.

Procesul apoptotic poate fi indus prin două căi moleculare de semnalizare. Calea extrinsecă operează prin intermediul a “death receptors” pe suprafața exterioară a celulei, iar calea intrinsecă este declanșată prin stimuli mitocondriali [36]. Ambele căi sunt interconectate prin alte proteine de semnalizare, cum ar fi NK- κ B și p53-MDM2, și converg la nivelul enzimelor proteolitice efectoare, numit caspaze.

În acest studiu am aratat că, in celulele Hela VEGFA reglează calea intrinsecă de semnalizare a apoptozei într-o maniera p53 independentă. Nu am gasit nici o dovadă de activare a p53 nici la nivel transcriptional si nici la nivel proteic. Gena p53 este o gena supresoare de tumoră cu un rol critic în reglarea apoptozei celulare si angiogeneza, dar mecanismele moleculare sunt departe de a fi pe deplin înțelese. Cu toate acestea, este bine cunoscut faptul ca

p53 poate duce la subexpresia unor proteine proangiogenice (VEGF, bFGF, etc) sau supraexpresia unor proteine antiangiogenice (TSP1, BAI-1, etc) [37].

În celulele deficitare în p53, apoptoza intrinsecă poate fi indusă de proteina tumorală p73 care are aparent numeroase principii de reglare și căi efectoare cu p53 [38]. Apoptoza p73-dependență pare să fie reglată în principal de capacitatea sa de a activa transcripțional aceleași gene țintă ca și p53 [rev in [39]], fiind, de asemenea, implicată în calea extrinsecă TRAIL de inducere a apoptozei [40]. Am găsit nivele ridicate de p73 mRNA, care sugerează un mecanism transcripțional de reglare VEGFA dependent a genei p73. Relația dintre p73 și VEGFA a fost intens studiată în cancerele umane, cu rezultate controversate, datele arătând atât funcții reglatoare pozitive [31, 41, 42] cât și negative [32] între aceste proteine. Rezultatele noastre sunt în concordanță cu alte studii care au raportat implicarea TP73 în procesul apoptotic al celulelor tumorale de col uterin [33-35, 43].

Calea extrinsecă de semnalizare a apoptozei este inițiată de stimularea "death" receptorilor transmembranari de către liganzi aparținând familiei factorului de necroză tumorală (TNF). Calea apoptotică extrinsecă poate fi declanșată de două tipuri de semnale intracelulare: în semnalul de tip I, stimularea directă este suficientă pentru a activa caspazele efectoare și de a induce apoptoza, în timp ce în celulele de tip II, semnalul este transmis printr-o activare a proteinei pro-apoptotice BCL-2 care angajează căile intrinseci apoptotice [43]. Atunci când această buclă de amplificare intrinsecă este activată, membrana mitocondrială este permeabilizată eliberând citocrom C și DIABLO [44] prin megacanalurile Bax/Bak. Deși ambele Bak și Bax sunt responsabile pentru permeabilizarea membranei mitocondriale, rezultatele noastre arată activare transcripțională numai pentru Bak1. Există două explicații posibile pentru acest fapt: fie Bax nu este activat printr-un mecanism de transcripție pentru aceste condiții experimentale sau activarea acestuia are loc prin intermediul p53. Cu toate acestea, activarea lui Bak a fost raportată a fi realizată într-un mod independent de p53 [45, 46]. Mai mult, un studiu anterior a arătat că Bak este mai important decât un Bax în inducerea apoptozei în celulele HeLa [47].

Proteinele pro-apoptotice sunt de obicei blocate de familia de proteine inhibitorii ai proteinelor apoptotice (IAP) și anti-apoptotice Bcl-2 prevenind astfel leziunile mitocondriale [48]. Se pare că, în celulele HeLa, inhibarea VEGFA induce un semnal apoptotic de tip II prin

reglarea transcripțională a genelor pro (Bak) și anti (c-IAP2) apoptotice. Mecanismul molecular exact al activității anti-apoptotice al c-IAP2 nu este încă pe deplin înțeles.

O schimbare în expresia nivelului mRNA a fost constatată, de asemenea pentru receptorii TRAIL, TNFRSF10A și TNFRSF10B. Creșterea valorii acestor receptori sugerează că inhibarea VEGFA ar putea promova apoptoza indusă prin TRAIL. Aparent p73, la fel ca p53, are capacitatea de a supraexprima acești receptori [49]. Wiley et al. [56] a emis ipoteza că TRAIL poate induce apoptoza în celulele tumorale sau transformate, dar nu și în celulele normale, mai târziu să se demonstreze că o varietate de celule tumorale exprimă acești receptori, dar nu tesuturile normale. Acest fapt este exploatat ca potențială terapie în tratamentul cancerului. Cu toate acestea, nu toate celulele tumorale sunt sensibile la terapia cu TRAIL [50], studiile privind mecanismele intracelulare de rezistență la TRAIL au identificat supraexprimarea unor molecule antiapoptotice sau prosupraviețuire ca fiind responsabile de eșecul tratamentului [51]. Supraexprimarea VEGFA ar putea fi unul din factorii modulatori ai acestei rezistențe.

Studiile au arătat că legarea liganzilor la TRAILR poate duce la activarea de alte căi de semnalizare, inclusiv a fosfoinositide 3-kinazei (PI3K)-Akt, cu stimularea proliferării celulare, migrării și supraviețuirii [52]. Creșterea ratei de proliferare celulară observată la 48h de tratament, comparativ cu controlul negativ ar putea fi explicată prin supraexprimarea Akt1 și ar putea indica un mecanism de rezistență prin activarea unor căi de semnalizare suplimentare. De asemenea, activarea Akt a fost arătat să blocheze apoptoza mediată prin p73 [53] promovând expresia VEGF atât în celulele tumorale cât și endoteliale [54, 55]. Acestea ar putea explica succesul pe termen scurt al tratamentelor antiVEGF.

4.5 Mecanismul transcripțional al angiogenezei și al apoptozei induse prin EGCG în celulele tumorale cervicale

4.5.1 Efectul EGCG asupra potențialului angiogenic al celulelor HeLa

ARN-ul extras din celulele tratate și cele netratate au fost evaluate pentru 84 de gene cunoscute ca fiind implicate în reglarea procesului angiogenic. Placa include factori de creștere și receptori, molecule de adeziune, citochine și chemochine, proteaze și proteine de matrice.

Cinci gene (B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH și ACTB) au fost folosite pentru normalizarea godelurilor. Analiza datelor a fost efectuată prin metoda $\Delta\Delta C_t$ folosind Superarray

Data Analysis Web Portal. Au fost considerate de interes toate genele cu un nivel de expresie cuprins între -1.5 și 1.5 pentru a evalua genele implicate în procesul antiogenic timpuriu. Au fost identificate nivele semnificativ statistic ($p < 0.05$) pentru 11 gene din totalul de 84 investigate. Patru gene au fost supraexprimate și șapte au fost subexprimate (Tabelul 4).

Tabel 4. Gene exprimate diferit după 24 de ore de tratament EGCG vs. control

Gene	Fold regulation
Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)	2.22
Inhibitor of DNA binding 1 (ID1)	1.98
Interferon beta 1 (IFN β 1)	2.49
Interleukin 1 beta (IL1- β)	1.77
Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)	-2.117
Granulocyte chemotactic protein 2 (CXCL6)	-1.6958
Ephrin A1 (EFNA1)	-1.7116
Platelet-derived growth factor alpha (PDGFA)	-1.6958
Transforming growth factor beta 2 (TGF- β 2)	-1.6764
Thrombospondin 1 (THBS1)	-3.2013
Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2 (TNFAIP2)	-1.5213

Trei dintre aceste gene au fost validate la nivel proteic prin ELISA. Rezultatele arată același pattern de expresie pentru proteinele investigate: subexprimarea proteinelor PDGFA și TGF β -2 și supraexprimarea IL1- β (Fig. 11).

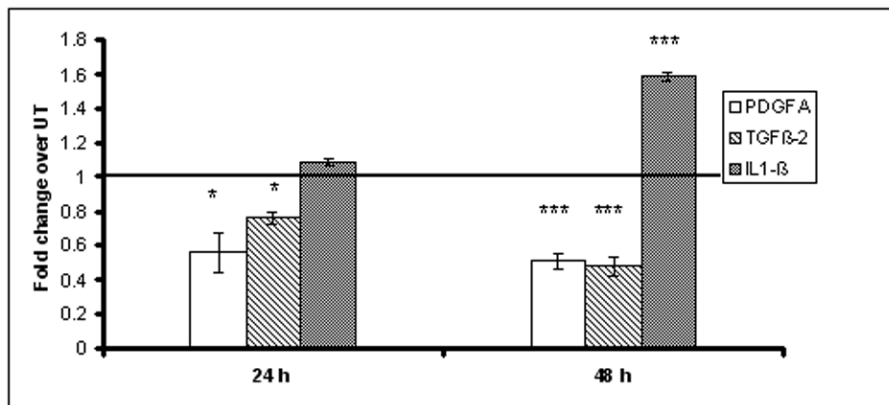


Fig. 11 Nivel de expresie a proteinelor după tratamentul EGCG raportat la grupul de control.

4.5.2 Effectul EGCG în potențialul apoptotic al celulelor HeLa

ARN-ul din celulele tratate cu EGCG (10 μ M), respectiv pentru grupul de control a fost analizat pentru expresia genică a 84 de gene cheie implicate în modularea procesului de apoptoză. Placa include liganzi TNF și receptorii lor, membrii ai familiei bcl-2, caspaze, IAP, TRAF, CARD, "death effector domain", familiile CIDE, precum și gene implicate în calea de semnalizare p53. Trei gene (B2M, HPRT1, GAPDH) au fost folosite pentru normalizarea tuturor genelor. Metoda $\Delta\Delta$ Ct a fost utilizată pentru calcularea nivelului de expresie. Genele cu un nivel de expresie cuprins între -1.25 și 1.25 au fost considerate de interes. Rezultatele noastre arată că există diferențe semnificative de expresie pentru 11 gene, 6 fiind supraexprimate și 5 subexprimate (Tabel 5).

Tabel 5 Gene exprimate diferit după 24 de ore de tratament EGCG versus control

Gene	Fold regulation
BCL2-antagonist/killer 1 (BAK1)	1.272
Lymphotoxin beta receptor (LTBR)	1.37
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21 (TNFRSF21)	1.502
CD27 molecule (CD27)	1.451
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (TNFSF10)	2.038
Tumor protein (TP73)	1.8319
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (TNFRSF11B)	-1.279
Baculoviral IAP repeat-containing 2 (BIRC2)	-1.336
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1 (BNIP1)	-1.25
Caspase recruitment domain family, member 8 (CARD8)	-1.39
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR)	-1.343

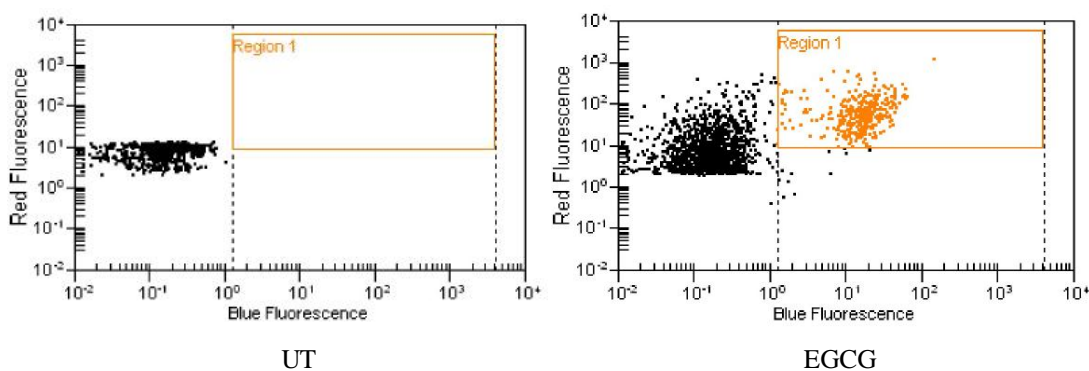


Fig. 12 Analiza apoptozei prin citometrie de flux în chip

Tratamentul EGCG a indus apoptoză semnificativă la 48 de ore după tratament (Fig. 12). Nu s-au observat celule apoptotice după 24 de ore.

4.5.3 Efectul EGCG în proliferarea celulelor HeLa

Am examinat efectul EGCG în proliferarea celulelor HeLa la 24 și 48 de ore după tratament prin testul MTT. În ambele timpuri, proliferarea celulară a fost semnificativ inhibată (Fig. 13). Tratamentul EGCG a indus un efect de inhibiție de 40% după 48 de ore; mai mult tratamentul EGCG a oprit complet procesul de proliferare, nu s-a observat nicio diferență notabilă între numărul de celule evaluate după 24 sau 48 de ore de incubare.

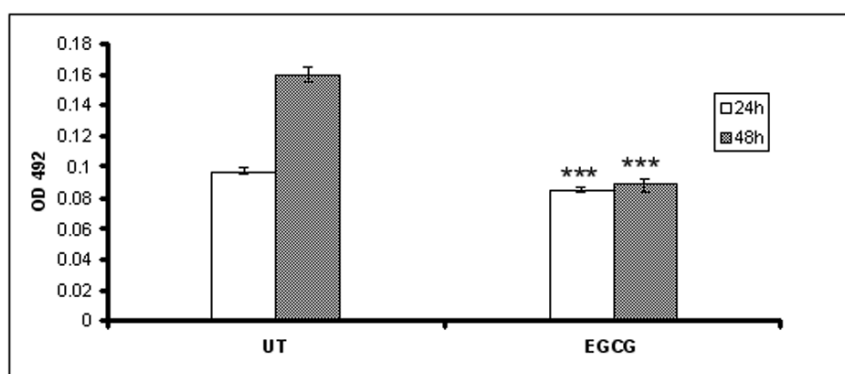


Fig. 13 Efectul EGCG în proliferarea celulelor HeLa după incubarea cu EGCG pentru 24 și 48 de ore

4.5.4 Efectul EGCG asupra atașamentului și împrăștierei celulare

În continuare, a fost evaluată influența EGCG în motilitatea și adeziunea celulară pe plăci pretratate cu Colagen de tip IV și Laminină (Fig. 14, Fig. 16), două componente importante ale ECM. Rezultatele noastre arată că (Fig. 14) după 48 de ore de tratament EGCG, atașamentul celulelor HeLa la colagenul de tip IV a fost stimulat, dar nu a avut nici un efect asupra adeziunii la laminină. Nu au existat diferențe în atașamentul celulelor observate la 24 de ore după tratament. Dacă celulele erau lăsate să atășeze pentru 20 de ore, adeziunea era inhibată considerabil (Fig. 15). Celulele netratate s-au prezentat cu filopodia și lamellipodia, caracteristice pentru celulele cu motilitate crescută, pe când majoritatea celulelor tratate EGCG au rămas rotunde chiar și după 20 de ore, indicând inhibiția motilității (Fig. 16).

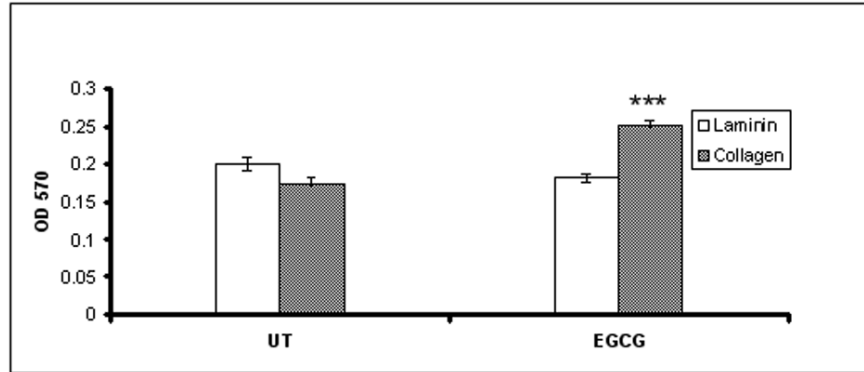


Fig. 14 Adeziunea celulelor HeLa la collagen si laminina după tratamentul EGCG

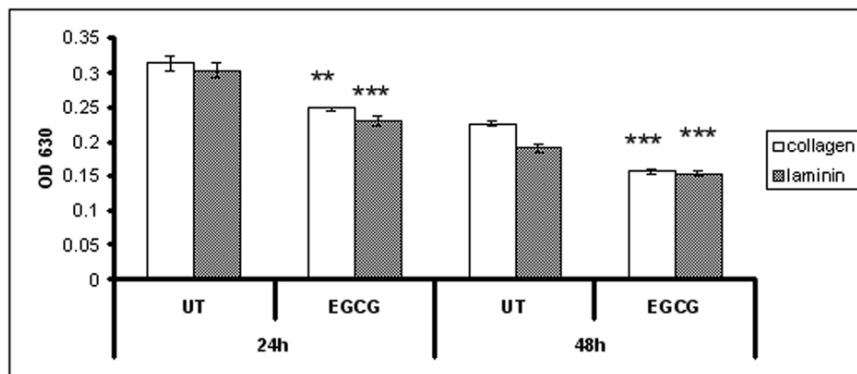


Fig. 15 Aderența celulară la collagen și laminină după 20 de ore de incubare

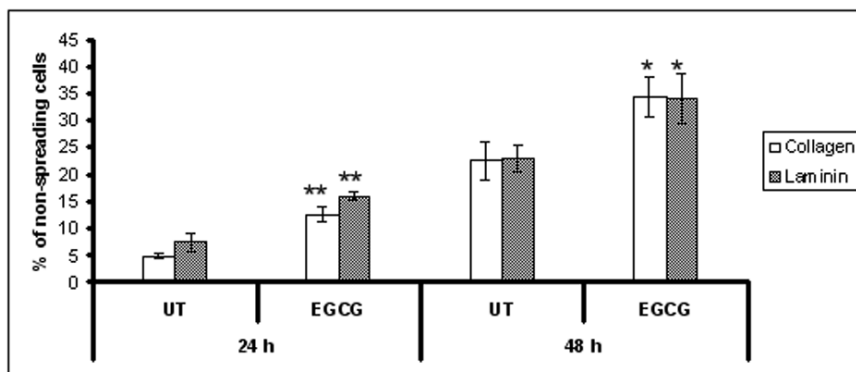


Fig. 16 Efectul tratamentului EGCG asupra motilității celulare

4.5.5 Atașarea la endoteliu

Pentru a cuantifica adeziunea celulelor HeLa la celulele HUVEC endoteliale, celulele HeLa au fost tratate cu EGCG și recoltate la 24 și 48 de ore după tratament. Celulele au fost adăugate peste un monostrat de celule HUVEC și incubate pentru 50 de minute. După

îndepărtarea celulelor neaderente, celule aderente au fost numărate. După cum se observă din Fig. 17, tratamentul EGCG reduce aderența la celulele endoteliale în funcție de timp.

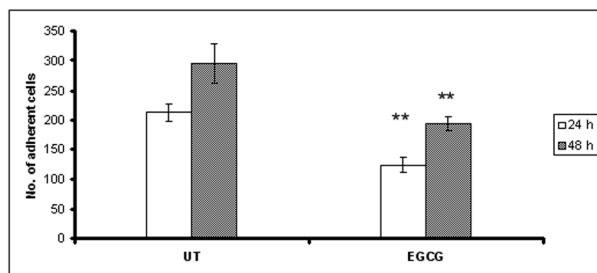


Fig. 17 Adeziunea celulelor HeLa la celulele endoteliale după tratamentul cu EGCG

4.5.6 Inhibiția migrației celulare prin EGCG

Migrația spre un chemoatractant este un fenotip celular distinct al celulelor tumorale metastatice, și este un pas important în invazia tumorală și metastazare. Deoarece cancerul cervical este asociat cu fenotipuri mai agresive, s-a examinat efectul EGCG asupra capacității de migrarea a celulelor HeLa (Fig. 18) folosind o metodă *in vitro*, care simulează procesul metastatic *in vivo*. După cum se observă din Fig. 18, tratamentul cu EGCG a indus o inhibiție puternică a migrației celulare, cauzând o reducere a migrației cu 48% și respectiv 68%.

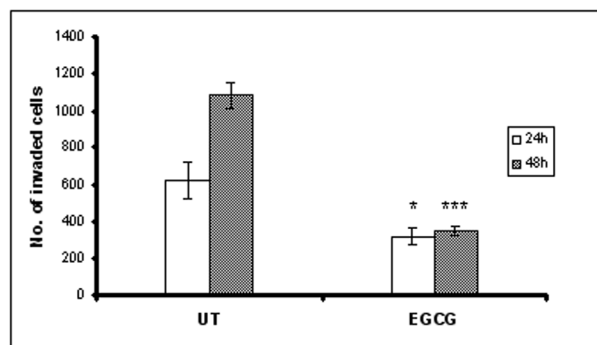


Fig. 18 Inhibiția migrației celulare prin tratamentul cu EGCG.

4.5.7 Discuții

Numeroase studii descriu efectele benefice ale consumului de ceai verde, multe dintre acestea indicând potențiale avantaje față de terapiile anticanceroase tradiționale, cum ar fi disponibilitatea și toxicitatea redusă în celulele sănătoase. Aceste observații au dus la investigarea unora din compușii prezenți în ceaiul verde în trialuri clinice. În momentul de față, există 51 de trialuri clinice care studiază efectele EGCG în diferite patologii, inclusiv unul în

cancerul cervical (informație disponibilă pe site-ul www.clinicaltrials.gov, informație accesată pe 12 martie 2011).

Până acum, mecanismul molecular de acțiune al EGCG ce induce efectele anticancerogene sunt neclare [56]. În acest studiu am investigat efectele antiangiogenice și antimetastatice ale tratamentului cu EGCG în celule tumorale cervicale HeLa.

Prin analiza expresiei genice a unui panel de 84 de gene implicate în angiogeneza am investigat mecanismul timpuriu molecular indus de EGCG. Analiza transcriptomică a arătat că EGCG modulează transcripțional gene implicate în procesul angiogenic (Tabel 4). Aceste gene modulează multiple mecanisme, cum ar fi proliferarea celulelor endoteliale (TNFAIP2, EFNA1, PDGFA, CXCL6, IFNB1, ID1), adeziune (THBS-1, CXCL6), migrare (EFNA1, THBS-1, TGF β -2, CCL-2) și invazie (ANGPTL4, THBS-1, TGF β -2, IL1- β , ID1).

Efectul anti-proliferativ al EGCG a fost investigat de numeroase grupuri [57-61]. Proliferarea și creșterea celulară pot fi promovate prin diverse căi de semnalizare, iar EGCG pare să interfereze cu aceste căi și să ducă la scăderea ratei de proliferare (Fig. 13). În numeroase tumori solide [62, 63], inclusiv în cele cervicale [64] s-a arătat că acestea exprimă receptori pentru PDGF, ceea ce sugerează că această moleculă acționează printr-un mecanism autocrin, susținând proliferarea celulară. Tratamentul cu EGCG duce la subexpresia genei PDGFA atât la nivel de mRNA cât și la nivel proteic, indicând că acesta ar putea fi unul din mecanismele responsabile pentru reducerea ratei de proliferare.

IL1- β pare să se angajeze diferite căi de semnalizare celulară, în funcție de tipul celular, și doză, ducând la deteriorare genotoxică, apoptoză sau creștere celulară [65]. În angiogeneza, TNF alfa și IL1- β induc nivele crescute de mRNA TNFAIP2 [66, 67] în timpul formării tuburilor capilare *in vitro* [66]. În cazul cancerului pulmonar IL1 β duce la supraexpresia CXCL6 și crește proliferarea celulelor tumorale [68]. Supraexpresia CXCL6 a fost asociată cu un fenotip metastatic în cancerul pulmonar [68] și de prostată [69]. În cancerul de prostată, CXCL6 a fost asociat cu creșterea adeziunii celulare la ECM și endoteliu [69]. Roomi, et al. a raportat recent că stimularea EGCG și IL1- β asupra celulelor HeLa duce la scăderea secreției de MMP-2 [70], o matrix metaloprotează crucială în invazia celulară. Rezultatele noastre arată că tratamentul EGCG pare să stimuleze transcripția de IL1- β și să scadă nivelul de TNFAIP2 și CXCL6.

Adițional reducerii ratei de proliferare celulară, tratamentul EGCG pare să moduleze, de asemenea, capacitatea de adeziune a celulelor la ECM și endoteliu. Testul atașamentului la ECM

nu a arătat nici un efect asupra aderenței rapide a celulelor la laminină, dar a arătat aderență crescută la colage de tip IV după 48 de ore de tratament (Fig. 14). Motilitatea celulară este un pas cheie în invazia celulelor tumorale și aderența crescută la ECM este primul indiciu a capacității de răspândire și potențial metastatic. Cu toate acestea, în cazul în care timpul de incubare a fost extins, celulele au pierdut atât aderența, precum și potențialul de raspandire (Fig. 15). De asemenea tratamentul EGCG a indus schimbarea semnificativă a morfologiei celulare indicând motilitate redusă (Fig. 16). Aceste observații ar putea fi explicate prin faptul că, chiar dacă celulele stabilesc inițial complexe focale cu ECM, acestea nu reușesc să se maturizeze în adeziuni focale stabile, proces afectat de tratament EGCG. Mai mult, a fost investigată capacitatea celulelor de aderare la un monostrat de celule endoteliale. Restabilirea conexiunilor adezive la endoteliul după intrarea în fluxul sanguin este un pas cheie în metastazarea celulelor tumorale [71]. Rezultatele noastre arată că tratamentul cu EGCG reduce adeziunea celulară la celulele endoteliale (Fig. 17).

Aderarea celulelor tumorale la ECM și endoteliul sunt în principal mediate prin căi de semnalizare prin integrine. THBS-1 sa dovedit a fi implicate în modularea acestor căi și poate afecta aderența celulelor tumorale [72], migrarea și invazia [73]. THBS-1 a fost propus de a avea atât proprietăți pro- și anti-metastatice [73, 74] prin controlul creșterii celulelor epiteliale, motilității [73], interacțiunile stromale/epiteliale și angiogeneza. THBS-1 sa dovedit a fi un inhibitor potent al angiogenezei prin mecanisme multiple, inclusiv prin interacțiunea directă cu VEGF și inhibarea MMP-9 [74, 75]. Cu toate acestea, studii recente au raportat efecte biologice diferite în progresia tumorală și metastazare [73, 74]. În general, efectele THBS-1 cu privire la potențialul metastatic tumoral, probabil depinde de modificările genetice și / sau epigenetice în celulele tumorale în sine, precum și efectele sale antiangiogenice asupra celulelor endoteliale [76].

Calea de semnalizare TGF- β este cunoscută a fi una dintre țintele THBS-1. Nivele ridicate de TGF- β au fost asociate cu diferite tumori de origine epitelială [77, 78] inclusiv tumori de col uterin [79, 80]. Multe dintre aceste tumori arată invazivitate crescută [81], în special cele care exprima în exces TGF- β 2 [82] și sunt corelate cu progresia CIN [83-85], fenotip metastatic crescut și/sau rezultate slabe la tratament [79].

În concluzie, tratamentul EGCG reduce proliferarea celulară, adeziunea la matrixul extracelular și endoteliu și invazivitatea celulară prin modularea la nivel transcriptional a expresiei genelor implicate în aceste procese.

Efectul apoptotic indus de tratamentul EGCG este mediat de reglarea proteinelor din familia TNF de receptori și liganzi. Ligandul TNFSF10 este supraexprimat în urma tratamentului, fiind arătat că acesta are un efect apoptotic pronunțat în celulele neoplastice, dar nu în cele normale [90]. TNSFR11B este o genă cu rol anti-apoptotic care este subexprimată în urma tratamentului cu EGCG. Studiile recente sugerează ca TNSFR11B joacă un rol important în organogeneza nodurilor limfatice și calcifierea vasculară.

Un event timpuriu în apoptoza indusă prin EGCG este reglarea genelor ce aparțin familiei “death receptor” și efectorilor acestora care sunt implicați în formarea “apoptosomului” care recrutează și activează caspaza 9 din calea intrinsecă.

Cunosterea mecanismelor responsabile pentru efectele biologice ale EGCG sunt absolut esențiale pentru ca acesta să fie propus ca și un agent chemopreventiv sau chemoterapeutic.

5 CONCLUZII

În conformitate cu obiectivele tezei, a fost evaluată implicarea mai multor factori pro-angiogenici în progresia a trei patologii de cancer diferite: de prostată, colo-rectal și cancerul de col uterin. Rezultatele noastre arată că, în patologia prostatei, patru din cele opt molecule evaluate au fost statistic semnificative în una sau mai multe etape de dezvoltare: KGF în PCa, comparativ cu HBP și CP, PDGFBB în HBP, comparativ cu CP, ANG2 în HBP și CP și TIMP-1 când sunt utilizate într-o determinare simultană. Determinarea celor alte patru molecule, angiogenin, ICAM-1, VEGF, bFGF a fost limitată de tehnologia utilizată pentru evaluare, un obstacol care poate fi depășit prin extinderea numărului de puncte incluse în curba standard. Datele noastre sugerează că analiza simultană a mai multor molecule implicate în angiogenază, în ser poate îmbunătăți diagnosticul în patologia prostatei într-un mod neinvaziv. Cu toate acestea, implicațiile acestor molecule, la nivel tumoral rămân încă sub investigație, valorile determinate în acest studiu, fiind o sumă a tuturor moleculelor secretate în sânge, care pot include procese inflamatorii sau de vindecare care nu sunt direct corelate cu dezvoltarea tumorală. Prin urmare, determinarea expresiei acestor molecule la nivel tumoral pare imperativ.

În cancerul colo-rectal, am observat o expresie mRNA mai mare în stadiile incipiente de dezvoltare a tumorii, cu diferențe semnificative statistic pentru FGFb și PDGF-BB atunci când se compară Dukes B cu Dukes C. Nu s-a obținut nici o diferență semnificativă pentru exprimarea VEGF în nici una din stadiile evaluate, probabil din cauza heterogenității tumorale, care este încă o problemă în evaluarea moleculară. Cu toate acestea, valorile obținute indică o supraexprimare a acestui factor în raport cu tesuturile normale.

Prin evaluarea implicării căii VEGFA / VEGFR2 de semnalizare în cancer de col uterin, am obținut un nivel mai ridicat de VEGFA în toate stadiile tumorale, dar spre surprinderea noastră, am constatat niveluri semnificativ scăzute pentru receptorii VEGFR2 cu avansarea tumorală, ceea ce sugerează că, în această patologie, angiogeneza este activată prin intermediul altor receptori. Prin comparația răspunsului tumoral la radioterapie cu expresia receptorilor, răspunsul a fost mai bun la pacienții cu nivele mai ridicate ale VEGFR2. Aceste rezultate indică faptul că angiogeneza activată prin intermediul altor receptori ar putea fi mai agresivă și să ducă la dezvoltarea de rezistență la radioterapie. Prin urmare, sunt necesare mai multe studii pentru a identifica ce alți receptori sunt implicați în susținerea angiogenezei în cancerul de col uterin.

Luată împreună, datele noastre sugerează că, dintre patologii investigate, angiogeneza este mai importantă în cancer de col uterin, prin urmare, studiile ulterioare au fost concentrate pe evaluarea strategiilor antiangiogenice în celule tumorale de col uterin.

Având în vedere că probele tumorale investigate au prezentat nivele crescute de VEGFA în comparație cu țesuturile normale, tehnologia ARN interferență a fost utilizată pentru inhibarea posttranscripțională a acestei gene ca și posibilă terapie antiangiogenică. Rezultatele noastre arată că inhibarea VEGFA duce la scăderea ratei de proliferare și induce apoptoza în celulele tratate, dar pentru o perioadă scurtă de timp, fenotipul inițial fiind restaurat după 72 de ore. Prin investigarea mecanismelor moleculare care guvernează acest comportament, am identificat că, deși calea principală angiogenică de semnalizare este inhibată potențialul angiogen este susținut prin activarea altor căi de semnalizare adiacente. Prin urmare, folosind VEGFA ca țintă terapeutică antiangiogenică unică în cancerul de col uterin nu a avut rezultatele scontate, sugerând necesitatea unei abordări multilaterale. Utilizarea ARN interferenței pentru „multitargeting” se află în stadii incipiente, tehnologia fiind limitată de lipsa unor agenți de transport siARN eficienți sau de nevoia de a crește concentrațiile siARN care induc toxicitate celulară. Prin urmare, prin

studierea literaturii, s-au identificat compuși naturali, care sunt descriși a avea posibilitatea de “multitargeting” în procesele tumorale.

EGCG s-a dovedit a avea proprietati antitumorale, datele existente sugerează un efect de multitargeting al acestei molecule asupra celulelor tumorale. Într-adevăr, prin tratarea celulelor tumorale cu EGCG, am observat inducerea apoptozei, scăderea ratei de proliferare, reducerea adeziunii celulare, motilității și potențialului invaziv al celulelor. Datele noastre arată că tratamentul EGCG modulează căi diferite implicate în angiogeneză și apoptoză controlând la nivel posttranscripțional mai multe gene care acționează atât asupra celulelor endoteliale cât și a celulelor tumorale. EGCG este un punct de plecare promițător pentru obținerea de noi medicamente împotriva cancerului; rezultatele noastre arată ca EGCG ar putea fi folosit ca un agent antiangiogenic și proapoptotic în tratamentul cancerului de col uterin.

6 REFERENCES

1. Society, A.C., *Global Cancer Facts and Figures*. 2011, American Cancer Society: Atlanta.
2. Mehta, P.B., et al., *Serum keratinocyte growth factor measurement in patients with prostate cancer*. *J Urol*, 2000. **164**(6): p. 2151-5.
3. Huang, Y.W., et al., *Effect of keratinocyte growth factor on cell viability in primary cultured human prostate cancer stromal cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **100**(1-3): p. 24-33.
4. Lind, A.J., et al., *Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer*. *Prostate*, 2005. **62**(4): p. 394-9.
5. Huss, W.J., et al., *Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch*. *Cancer Res*, 2001. **61**(6): p. 2736-43.
6. Murdoch, C., et al., *Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2*. *J Immunol*, 2007. **178**(11): p. 7405-11.
7. Caine, G.J., et al., *Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1*. *Eur J Clin Invest*, 2003. **33**(10): p. 883-90.
8. Caine, G.J., et al., *Significant decrease in angiopoietin-1 and angiopoietin-2 after radical prostatectomy in prostate cancer patients*. *Cancer Lett*, 2007. **251**(2): p. 296-301.
9. Jiang, Y., I.D. Goldberg, and Y.E. Shi, *Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer*. *Oncogene*, 2002. **21**(14): p. 2245-52.
10. Brehmer, B., S. Biesterfeld, and G. Jakse, *Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2003. **6**(3): p. 217-22.
11. Liu, A.Y., et al., *Analysis of prostate cancer by proteomics using tissue specimens*. *J Urol*, 2005. **173**(1): p. 73-8.
12. Lein, M., et al., *[Metalloproteinases (MMP-1, MMP-3) and their inhibitors (TIMP) in blood plasma of patients with prostate carcinoma]*. *Urologe A*, 1998. **37**(4): p. 377-81.
13. Cook, D.M., et al., *AACE Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of acromegaly*. *Endocr Pract*, 2004. **10**(3): p. 213-25.
14. Koike, T., et al., *Inhibited angiogenesis in aging: a role for TIMP-2*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2003. **58**(9): p. B798-805.
15. Robinet, A., et al., *Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 2): p. 343-56.

16. Kim, H.E., et al., *Platelet-derived growth factor (PDGF)-signaling mediates radiation-induced apoptosis in human prostate cancer cells with loss of p53 function*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997. **39**(3): p. 731-6.
17. Des Guetz, G., et al., *Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(12): p. 1823-32.
18. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
19. Wang, C., et al., *Mechanism of antitumor effect of a novel bFGF binding peptide on human colon cancer cells*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(5): p. 1212-8.
20. Tassi, E. and A. Wellstein, *Tumor angiogenesis: initiation and targeting - therapeutic targeting of an FGF-binding protein, an angiogenic switch molecule, and indicator of early stages of gastrointestinal adenocarcinomas*. *Cancer Res Treat*, 2006. **38**(4): p. 189-97.
21. Fujimoto, K., et al., *Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis*. *Eur J Cancer*, 1998. **34**(9): p. 1439-47.
22. Takahashi, Y., et al., *Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells*. *J Natl Cancer Inst*, 1996. **88**(16): p. 1146-51.
23. Cheng, W.F., et al., *Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma*. *Obstet Gynecol*, 1999. **93**(5 Pt 1): p. 761-5.
24. Loncaster, J.A., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(5): p. 620-5.
25. Cheng, W.F., et al., *Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma*. *Obstet Gynecol*, 2000. **96**(5 Pt 1): p. 721-6.
26. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
27. Lee, T.H., et al., *Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1*. *PLoS Med*, 2007. **4**(6): p. e186.
28. Fragoso, R., et al., *VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease*. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1608-16.
29. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
30. Wedam, S.B., et al., *Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(5): p. 769-77.

31. Vikhanskaya, F., et al., *p73 Overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis*. *Oncogene*, 2001. **20**(50): p. 7293-300.
32. Salimath, B., D. Marme, and G. Finkenzeller, *Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73*. *Oncogene*, 2000. **19**(31): p. 3470-6.
33. Singh, M. and N. Singh, *Induction of apoptosis by hydrogen peroxide in HPV 16 positive human cervical cancer cells: involvement of mitochondrial pathway*. *Mol Cell Biochem*, 2008. **310**(1-2): p. 57-65.
34. Wakatsuki, M., et al., *p73 protein expression correlates with radiation-induced apoptosis in the lack of p53 response to radiation therapy for cervical cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008. **70**(4): p. 1189-94.
35. Oh, Y.K., et al., *Role of activating transcription factor 3 on TAp73 stability and apoptosis in paclitaxel-treated cervical cancer cells*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(7): p. 1232-49.
36. Burz, C., et al., *Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets*. *Acta Oncol*, 2009. **48**(6): p. 811-21.
37. Teodoro, J.G., S.K. Evans, and M.R. Green, *Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome*. *J Mol Med*, 2007. **85**(11): p. 1175-86.
38. Bitomsky, N. and T.G. Hofmann, *Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2*. *FEBS J*, 2009. **276**(21): p. 6074-83.
39. Pietsch, E.C., et al., *The p53 family and programmed cell death*. *Oncogene*, 2008. **27**(50): p. 6507-21.
40. Sayan, A.E., et al., *P73 and caspase-cleaved p73 fragments localize to mitochondria and augment TRAIL-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2008. **27**(31): p. 4363-72.
41. Guan, M., et al., *p73 Overexpression and angiogenesis in human colorectal carcinoma*. *Jpn J Clin Oncol*, 2003. **33**(5): p. 215-20.
42. Diaz, R., et al., *p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(5): p. 1060-7.
43. Green, D.R., *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. *Cell*, 2000. **102**(1): p. 1-4.
44. Ozoren, N. and W.S. El-Deiry, *Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL*. *Neoplasia*, 2002. **4**(6): p. 551-7.
45. Sot, B., S.M. Freund, and A.R. Fersht, *Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(40): p. 29193-200.
46. Tong, Q.S., et al., *BAK overexpression mediates p53-independent apoptosis inducing effects on human gastric cancer cells*. *BMC Cancer*, 2004. **4**: p. 33.

47. Pearce, A.F. and D.S. Lyles, *Vesicular stomatitis virus induces apoptosis primarily through Bak rather than Bax by inactivating Mcl-1 and Bcl-XL*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9102-12.
48. Scorrano, L. and S.J. Korsmeyer, *Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(3): p. 437-44.
49. Muller, M., et al., *TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma*. Cell Death Differ, 2005. **12**(12): p. 1564-77.
50. Dyer, M.J., M. MacFarlane, and G.M. Cohen, *Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy*. J Clin Oncol, 2007. **25**(28): p. 4505-6.
51. Mahalingam, D., et al., *TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?* Cancer Treat Rev, 2009. **35**(3): p. 280-8.
52. Falschlehner, C., et al., *TRAIL signalling: decisions between life and death*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(7-8): p. 1462-75.
53. Basu, S., et al., *Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 11-23.
54. Jiang, B.H., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1749-53.
55. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
56. Li, W.G., Q.H. Li, and Z. Tan, *Epigallocatechin gallate induces telomere fragmentation in HeLa and 293 but not in MRC-5 cells*. Life Sci, 2005. **76**(15): p. 1735-46.
57. Qiao, Y., et al., *Cell growth inhibition and gene expression regulation by (-)-epigallocatechin-3-gallate in human cervical cancer cells*. Arch Pharm Res, 2009. **32**(9): p. 1309-15.
58. Yokoyama, M., et al., *Antiproliferative effects of the major tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate and retinoic acid in cervical adenocarcinoma*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(2): p. 326-31.
59. Yokoyama, M., et al., *The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines*. Gynecol Oncol, 2004. **92**(1): p. 197-204.
60. Noguchi, M., et al., *Inhibitory effect of the tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate, on growth of cervical adenocarcinoma cell lines*. Cancer Lett, 2006. **234**(2): p. 135-42.
61. Ahn, W.S., et al., *A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression*. DNA Cell Biol, 2003. **22**(3): p. 217-24.
62. Pietras, K., et al., *PDGF receptors as cancer drug targets*. Cancer Cell, 2003. **3**(5): p. 439-43.

63. Board, R. and G.C. Jayson, *Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics*. Drug Resist Updat, 2005. **8**(1-2): p. 75-83.
64. Taja-Chayeb, L., et al., *Expression of platelet derived growth factor family members and the potential role of imatinib mesylate for cervical cancer*. Cancer Cell Int, 2006. **6**: p. 22.
65. Roy, D., S. Sarkar, and Q. Felty, *Levels of IL-1 beta control stimulatory/inhibitory growth of cancer cells*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 889-98.
66. Sarma, V., et al., *Cloning of a novel tumor necrosis factor-alpha-inducible primary response gene that is differentially expressed in development and capillary tube-like formation in vitro*. J Immunol, 1992. **148**(10): p. 3302-12.
67. Wolf, F.W., et al., *B94, a primary response gene inducible by tumor necrosis factor-alpha, is expressed in developing hematopoietic tissues and the sperm acrosome*. J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3633-40.
68. Zhu, Y.M., S.M. Bagstaff, and P.J. Woll, *Production and upregulation of granulocyte chemotactic protein-2/CXCL6 by IL-1beta and hypoxia in small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(12): p. 1936-41.
69. Engl, T., et al., *Prostate tumor CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix*. Life Sci, 2006. **78**(16): p. 1784-93.
70. Roomi, M.W., et al., *In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors*. Oncol Rep, 2010. **23**(3): p. 605-14.
71. Eccles, S.A. and D.R. Welch, *Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1742-57.
72. Wilson, K.E., et al., *Beta 1 integrin- and proteoglycan-mediated stimulation of T lymphoma cell adhesion and mitogen-activated protein kinase signaling by thrombospondin-1 and thrombospondin-1 peptides*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3621-8.
73. Yee, K.O., et al., *The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **114**(1): p. 85-96.
74. Kazerounian, S., K.O. Yee, and J. Lawler, *Thrombospondins in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(5): p. 700-12.
75. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 65-71.
76. Nucera, C., et al., *B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(23): p. 10649-54.
77. Derynck, R., et al., *Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells*. Nature, 1985. **316**(6030): p. 701-5.

78. Pasche, B., *Role of transforming growth factor beta in cancer*. J Cell Physiol, 2001. **186**(2): p. 153-68.
79. Hazelbag, S., et al., *Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival*. J Pathol, 2007. **212**(3): p. 316-24.
80. Diaz-Chavez, J., et al., *Down-regulation of transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-betaRII) protein and mRNA expression in cervical cancer*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 3.
81. Welch, D.R., A. Fabra, and M. Nakajima, *Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(19): p. 7678-82.
82. Gold, L.I., et al., *TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis*. J Pathol, 2000. **190**(5): p. 579-88.
83. Baritaki, S., et al., *Overexpression of VEGF and TGF-beta1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection*. Int J Oncol, 2007. **31**(1): p. 69-79.
84. Soufla, G., et al., *VEGF, FGF2, TGFBI and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix*. Cancer Lett, 2005. **221**(1): p. 105-18.
85. Tervahauta, A., et al., *Expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 in human papillomavirus (HPV)-associated lesions of the uterine cervix*. Gynecol Oncol, 1994. **54**(3): p. 349-56.
86. Harrington, H.A., et al., *Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis*. Theor Biol Med Model, 2008. **5**: p. 26.
87. D'Archivio, M., et al., *Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: relevance for cancer prevention*. Int J Mol Sci, 2008. **9**(3): p. 213-28.
88. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
89. Nihrane, A., et al., *Depletion of the Shwachman-Diamond syndrome gene product, SBDS, leads to growth inhibition and increased expression of OPG and VEGF-A*. Blood Cells Mol Dis, 2009. **42**(1): p. 85-91.
90. Wu, C.H., C.H. Kao, and A.R. Safa, *TRAIL recombinant adenovirus triggers robust apoptosis in multidrug-resistant HL-60/Vinc cells preferentially through death receptor DR5*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(7): p. 731-43.
91. Benschop, R., T. Wei, and S. Na, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21: TNFR-related death receptor-6, DR6*. Adv Exp Med Biol, 2009. **647**: p. 186-94.

92. Ahmad, N., S. Gupta, and H. Mukhtar, *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells*. Arch Biochem Biophys, 2000. **376**(2): p. 338-46.
93. Leu, J.I. and D.L. George, *Hepatic IGFBP1 is a prosurvival factor that binds to BAK, protects the liver from apoptosis, and antagonizes the proapoptotic actions of p53 at mitochondria*. Genes Dev, 2007. **21**(23): p. 3095-109.
94. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
95. French, L.E. and J. Tschopp, *Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 117-23.
96. Galati, G. and P.J. O'Brien, *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(3): p. 287-303.
97. Muzolf-Panek, M., et al., *Role of catechin quinones in the induction of EpRE-mediated gene expression*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(12): p. 2352-60.
98. Stangl, V., et al., *Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 348-58.
99. Costanzo, A., et al., *DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes*. Mol Cell, 2002. **9**(1): p. 175-86.
100. Qin, J., et al., *A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(4): p. 852-7.
101. Amin, A.R., et al., *SHP-2 tyrosine phosphatase inhibits p73-dependent apoptosis and expression of a subset of p53 target genes induced by EGCG*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5419-24.