



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie al Academiei Române

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**O nouă strategie de inhibiție a funcționalității STAT3, bazată pe
minicercuri ADN, în cancerul ovarian**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
CSI Prof. Dr. Ștefan-Eugen Szedlacsek

DOCTORAND:
Puiu Adina-Gabriela (Vasilescu)

CUPRINS

LISTĂ DE ABREVIERI.....	3
I. INTRODUCERE.....	5
Ipoteza.....	7
Obiectivele acestei teze.....	7
II. PARTE TEORETICĂ.....	8
1. PROTEINELE STAT.....	8
1.1 Structură și izoforme.....	8
1.2 Semnalizare celulară.....	11
1.3 Funcții în celulă.....	13
1.4 Implicații în boală.....	15
2. STAT3.....	17
2.1 Reglajul activității lui STAT3.....	18
2.2 Patologii asociate cu STAT3.....	20
2.2.1 Implicarea lui STAT3 în Cancerul Ovarian.....	22
2.3 Inhibiția semnalizării STAT3.....	24
2.3.1 Inhibiție indirectă.....	24
2.3.2 Inhibiție directă.....	25
3. OLIGONUCLEOTIDELE CA INHIBITORI EFICIENȚI AI DOMENIULUI DE LEGARE ADN AL LUI STAT3	27
3.1 ODN-uri lineare.....	27
3.2 ODN-uri circulare.....	28
III. PARTE EXPERIMENTALĂ.....	30
1. MATERIALE ȘI METODE.....	32
1.1 Culturi celulare.....	32
1.2 Oligonucleotidele anti-STAT3 și mock utilizate pentru obținerea minicercurilor.....	32
1.3 Ciclizarea oligonucleotidelor utilizând splinturile corespunzătoare.....	33
1.4 Purificarea cercurilor monocatenare, hibridizarea pentru obținerea formelor dublu- catenare și validarea enzimatică.....	34
1.5 Analiza capacității de interacție a anti-STAT3 mcDNA cu proteina STAT3, utilizând testul de mobilitate electroforetică (EMSA).....	36
1.6 Evaluarea eficienței transfecției.....	36

1.7 Protocolul de transfecție a minicercurilor anti-STAT3 și mock în celulele canceroase ovariene SKOV3.....	37
1.8 Testul MTS	38
1.9 Microscopia celulelor SKOV3 transfectate.....	38
1.10 Determinarea eficienței transfecției prin analiza de citometrie în flux.....	39
1.11 Evaluarea apoptozei/necrozei induse de minicercuri prin citometrie în flux.....	39
1.12 Testele RT-qPCR.....	40
1.13 Analiza Western blot.....	42
1.14 Analiza datelor și statistică.....	43
2. REZULTATE.....	45
2.1 Proiectarea și principiul obținerii minicercurilor.....	45
2.2 Producerea minicercurilor ADN monocatenare și validarea lor prin digestie enzimatică	46
2.3 Producerea minicercurilor ADN dublu-catenare și validarea lor prin digestie enzimatică	47
2.4 Amplificarea prin PCR a lui anti-STAT3 mcDNA este inhibată.....	50
2.5 Anti-STAT3 mcDNA interacționează specific cu proteina STAT3.....	52
2.6 Celulele SKOV3 pot fi transfectate eficient	55
2.7 Tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA scade viabilitatea celulelor SKOV3 de cancer ovarian.....	60
2.8 Tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA induce apoptoză și necroză în celule SKOV3.....	63
2.9 Anti-STAT3 mcDNA reduce proliferarea celulelor SKOV3 de cancer ovarian.....	67
2.10 Minicercul anti-STAT3 reduce expresia genelor pro-supraviețuire și anti-apoptoză...70	
3. DISCUȚII.....	75
Limitările studiului.....	79
Perspective.....	80
IV. CONCLUZII.....	81
MULȚUMIRI.....	83
Lista publicațiilor relevante din timpul pregătirii doctorale.....	85
Lista cu figurile acestei teze.....	86
Lista cu tabelele acestei teze.....	87
BIBLIOGRAFIE.....	88

I. INTRODUCERE

Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) este un factor de transcriere cu un rol esențial în reglarea creșterii, diferențierii, supraviețuirii și funcției imunitare celulare (Timofeeva et al., 2012). În cadrul căii de semnalizare JAK/STAT3, după stimularea unor receptori specifici, proteinele Janus Kinase (JAK) sunt activate și fosforilează STAT3, determinând dimerizarea, activarea și translocarea acestuia în nucleu (Bild, Turkson & Jove, 2002). Aici, STAT3 leagă elemente de răspuns specifice, cum ar fi motivele de tip „secvență activată de Interferonul gamma” (GAS-like), situate în promotorii genelor țintă (Ivashkiv & Donlin, 2014). Expresia acestor gene este astfel modulată de STAT3, contribuind la controlul proceselor celulare menționate mai sus. În condiții fiziologice normale, activarea STAT3 este strict controlată și tranzitorie (Timofeeva et al., 2012). Cu toate acestea, activarea persistentă a STAT3 a fost implicată în dezvoltarea și progresia mai multor tumori maligne, inclusiv cancerul ovarian. Alterarea reglajului său poate perturba homeostazia celulară, contribuind la proliferarea necontrolată, rezistența la apoptoză și crearea unui micromediu tumoral imunosupresor (TME) (Huang et al., 2000; Cheung, Leung & Wong, 2006; Davidson, Tropé & Reich, 2012; Jia et al., 2017). Cancerul ovarian este recunoscut ca fiind una dintre cele mai severe transformări maligne ginecologice la nivel global, datorită progresiei sale silențioase și detectării în stadiu avansat, cu peste 200.000 de cazuri noi anual (Ren et al., 2025). Prin urmare, există o nevoie stringentă de a dezvolta noi compuși terapeutici specifici împotriva acestei boli. În contextul cancerului ovarian, semnalizarea aberantă STAT3 este deosebit de semnificativă și este asociată cu un prognostic nefavorabil, progresia bolii către stadii avansate și rezistență la chimioterapie, prin creșterea expresiei genelor de proliferare și supraviețuire, cum ar fi *ciclina D1*, *c-myc*, *survivina*, *MCL1* (myeloid cell leukemia-1), *PIMI* (Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase) sau MMP-uri (gene pentru metaloproteinazele matriceale), suprimând în același timp apoptoza și amplificând angiogeneza (Huang et al., 2000; Wu et al., 2019).

Prin urmare, STAT3 este explorat intens drept țintă terapeutică, diverși inhibitori fiind investigați pentru a perturba semnalizarea sa în cancer și a restabili funcția celulară normală. Eforturile de a inhiba semnalizarea STAT3 au inclus inhibitori care vizează citokinele (de exemplu, IL-6) sau receptorii citokinelor, cum ar fi IL-6R, dar nu au demonstrat un efect semnificativ asupra tumorilor solide în stadiu avansat și pot declanșa efecte colaterale (Angevin et al., 2014; Goumas et al., 2015; Baran et al., 2018). Inhibitorii

JAK, chiar dacă unii dintre ei sunt deja aprobați de FDA, prezintă efecte secundare sistemice pronunțate (Qian, Xue & Shannon, 2022; Verstovsek et al., 2012). Au fost utilizate și peptide și molecule mici care vizează domeniul Src Homology 2 (SH2) al lui STAT3 (de exemplu, inhibitorul care conține motivul PYLGTK, sau STATTIC), însă acestea sunt împiedicate adesea de o permeabilitate membranară scăzută și o eficacitate insuficientă, din cauza afinității și specificității scăzute (Turkson et al., 2001; Schust et al., 2006). Abordările bazate pe acizi nucleici, precum oligonucleotidele antisens, care sunt menite să degradeze ARN mesager pentru STAT3, se confruntă cu provocări legate de instabilitate și efecte nespecifice, în afara țintei, în ciuda potențialului lor (Roth, 2005; Zhang et al., 2024). Oligodeoxinucleotidele capcană (ODN-decoy) care imită situsurile de legare pentru STAT3 și acționează ca și competitori pentru domeniul de legare ADN (DBD) al lui STAT3 au fost studiate în mai multe tipuri de cancer și au arătat rezultate promițătoare *in vitro*, dar au fost limitate de degradarea rapidă *in vivo* (Gu et al., 2008; Sen et al., 2009, 2012; Souissi et al., 2011).

Pentru a adresa aceste limitări, am dezvoltat și caracterizat un minicerc ADN dublu catenar (prescurtat anti-STAT3 mcDNA), care conține trei motive de tip GAS pentru a acționa ca o capcană stabilă pentru STAT3. Astfel, pentru a răspunde nevoii pentru terapie personalizată în cancerul ovarian, am folosit o nouă strategie de design și validare pentru a crea această moleculă și am utilizat-o pentru prima dată în acest studiu pentru a inhiba STAT3 în celulele canceroase ovariene. Deoarece SKOV3 este a cincea linie celulară cu cea mai mare expresie a STAT3, a fost aleasă ca model pentru această boală (The Human Protein Atlas, 2025). Ne așteptăm ca acest minicerc să captureze eficient STAT3, să reducă activarea genelor țintă și să inhibe proliferarea, promovând în același timp apoptoza în celulele canceroase ovariene SKOV3.

Considerăm că minicercul dezvoltat oferă mai multe avantaje cheie: (i) trei motive de tip GAS pe o singură moleculă, ceea ce sporește probabilitatea sa de a interacționa cu DBD al STAT3; (ii) configurația circulară închisă care îmbunătățește stabilitatea moleculară și protejează împotriva degradării mediate de nucleaze; (iii) probabilitatea unui timp de înjumătățire extins după administrarea *in vivo* și (iv) simplitatea sa, constând în ADN nemodificat chimic, ceea ce permite o producție eficientă financiar. Ne așteptăm ca aceste attribute să conducă la o strategie semnificativ eficientă pentru inhibarea activității STAT3 în cancerul ovarian, precum și în alte cancere reglate de STAT3.

Prezenta teză este compusă dintr-o Parte Teoretică și o Parte Experimentală. Parte Teoretică oferă o imagine de ansamblu asupra universului proteinelor STAT, cu accent pe

STAT3, evidențiind aspecte precum structura, funcțiile celulare, reglarea și implicațiile în boală care au determinat alegerea de a aborda proteina STAT3 în cancerul ovarian ca subiect al acestei teze.

Partea experimentală reprezintă contribuția personală a autoarei acestei teze. În acest studiu, raportăm designul, validarea și evaluarea *in vitro* a anti-STAT3 mcDNA, precum și a unui minicerc control (denumit mock mcDNA) cu motive de tip GAS modificate, în celule canceroase ovariene SKOV3. Mai întâi, am circularizat oligonucleotidele precursorare printr-o metodă de ligare enzimatică. Circularizarea a fost apoi validată prin restricție enzimatică la situsuri specifice, iar specificitatea de legare a anti-STAT3 mcDNA la proteina STAT3 a fost evaluată prin testul de mobilitate electroforetică (EMSA). În experimentele de MTS, citometrie în flux și Western blot, am arătat că anti-STAT3 mcDNA a provocat: inhibare specifică semnificativă, apoptoză și scădere a proliferării celulelor canceroase ovariene SKOV3 cu STAT3 activ. În plus, tehnicile de PCR cantitativ și Western blot au demonstrat un reglaj negativ semnificativ al genelor anti-apoptoză și pro-supraviețuire, *MCL1* și *PIM1*, în celulele SKOV3 tratate cu anti-STAT3 mcDNA, comparativ cu minicercul mock. Toate aceste rezultate obținute dezvăluie potențialul acestui compus ca o nouă strategie terapeutică pentru inhibarea semnalizării STAT3 în cancerul ovarian. Această strategie ar putea fi explorată și în alte tumori maligne induse de STAT3.

Ipoteza

Un minicerc ADN care țintește STAT3 va acționa ca o capcană pentru această proteină, reducând astfel activitatea genelor modulate de STAT3 și provocând inhibare, apoptoză și proliferare scăzută a celulelor canceroase ovariene SKOV3.

Obiectivele acestei teze

- Proiectarea unui minicerc ADN dublu-catenar care vizează proteina STAT3
- Dezvoltarea minicercului ADN și validarea structurii sale
- Evaluarea interacției dintre minicercul ADN și STAT3
- Determinarea concentrației inhibitorii a minicercului ADN în celulele model de cancer ovarian
- Determinarea efectelor funcționale ale minicercului ADN asupra unor celule canceroase ovariene reprezentative
- Evaluarea expresiei genelor modulate de STAT3 utilizând un model celular pentru cancerul ovarian, la tratamentul cu minicercul ADN

II. PARTE TEORETICĂ

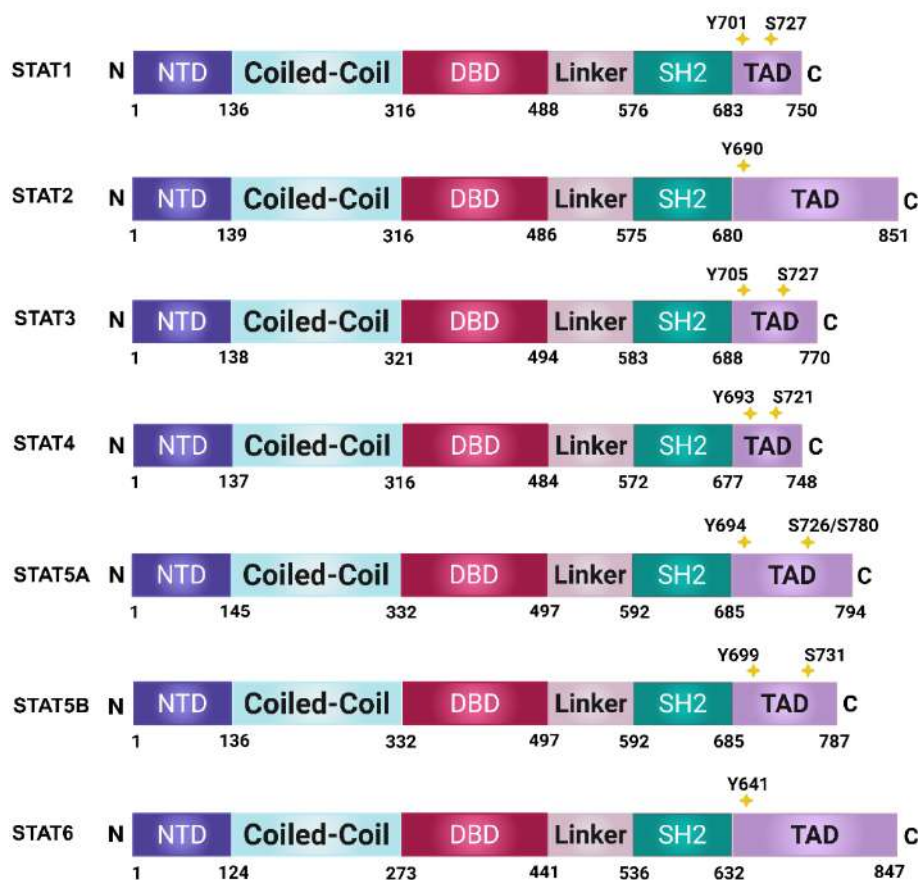
1. PROTEINELE STAT

Familia de proteine STAT este formată din șapte membri: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B și STAT6, fiecare dintre ei fiind codificat de gena corespunzătoare. În ciuda localizării lor diferite, analiza comparativă a secvențelor și studiile de cristalografie au arătat că proteinele STAT prezintă o structură extrem de conservată (Becker, Groner & Müller, 1998; Calò et al., 2003). Masele moleculare ale proteinelor STAT, în funcție de membru, variază de la 80 la 100 kDa (Hendry & John, 2004). Proteinele STAT au o lungime de 750-900 resturi de aminoacizi și cuprind șase domenii, fiecare cu un rol bine stabilit (Lim & Cao, 2006).

La capătul N-terminal, toate proteinele STAT prezintă un **domeniu N-terminal** (NTD), care conține alfa-helixuri și este foarte important pentru interacțiunile stabilite cu alți factori de transcriere sau cofactori, facilitând procesul de dimerizare, în prezența sau absența fosforilării (Strehlow & Schindler, 1998). **Domeniul coiled-coil** (CCD) este numit și domeniul all-helix, dat fiind faptul că este o superspiralizare formată doar din alfa-helixuri. Datorită prezenței unui semnal de localizare nucleară (NLS), este implicat și în acele interacțiuni proteice necesare importului nuclear (Awasthi, Liongue & Ward, 2021). În continuare, **domeniul de legare ADN** (DBD), cu o pliere asemănătoare imunoglobulinei, este crucial pentru reglarea pe care proteinele STAT o exercită asupra genelor țintă. Prin intermediul acestui domeniu, STAT se leagă de motivele specifice ADN localizate în promotorul genei țintă. De asemenea, s-a descoperit că acest domeniu este implicat și în importul nuclear (Horvath, Wen și Darnell, 1995; Awasthi, Liongue și Ward, 2021). **Domeniul linker** (LD) este scurt și asigură organizarea structurală a proteinelor STAT în timpul fazei de activare și a fazei de legare la ADN, fiind implicat fizic și în formarea complexului de transcriere (Yang et al., 1999). **Domeniul de omologie Src2** (Domeniul SH2) recunoaște și leagă motive specifice care conțin tirozine fosforilate la nivelul receptorilor. De asemenea, la fosforilarea tirozinei, acesta funcționează ca punct de contact pentru homo- sau heterodimerizarea proteinelor STAT prin domeniile lor SH2 (Liu, Gaffen & Goldsmith, 1998; Lim & Cao, 2006). Nu în ultimul rând, la capătul C-terminal, există un **domeniu variabil de transactivare** (TAD) care ajută la procesul de reglare a transcrierii genelor țintă, interacționând cu și recrutând co-activatori (cum ar fi acetiltransferazele histonice) în complexul ADN-proteină. De asemenea, conține aminoacizi cheie de fosforilare, cum ar fi tirozinele care, odată fosforilate de o tirozin kinază (cum ar fi JAK),

facilitează dimerizarea și translocarea nucleară a proteinelor STAT. Alte resturi de serină din acest domeniu pot modula activarea transcrierii genelor țintă (Zhang, Li & Watowich, 2016).

Figurea 1 prezintă o comparație între domeniile proteinelor STAT.



Figurea 1: Comparație structurală între membrii familiei STAT. Realizat în <https://BioRender.com> de către Puiu Adina-Gabriela (Vasilescu).

Pentru a explica calea canonică de activare a STAT, premisa general acceptată este că proteinele STAT există ca monomeri inactivi în citoplasmă și necesită fosforilare pentru a dimeriza (Ivashkiv & Hu, 2004). Semnale extracelulare specifice, precum factorii de creștere și citokinele, se leagă de receptori transmembranari corespunzători. Această conexiune între ligand și receptor determină receptori tirozinkinazici (cum ar fi receptori factorilor de creștere) să sufere modificări conformaționale, să dimerizeze și să se autofosforileze, sau receptori non-tirozinkinazici (cum ar fi receptori citokinelor) să dimerizeze și să recruteze proteine JAK în proximitatea membranei celulare (Lim & Cao, 2006; Hu et al., 2021). JAK se transfosforilează și transactivează, fosforilând în continuare resturile de tirozină din domeniul citoplasmatic al receptorilor. Odată fosforilați, receptori creează situsuri de andocare pentru proteinele STAT (Liang et al., 2024). La andocarea la

receptor, prin recunoașterea fosfotirozinelor receptorului de către domeniul SH2 al STAT, fiecare moleculă STAT este fosforilată de JAK și disociază de receptor (Bild, Turkson & Jove, 2002). Apoi, proteinele STAT fosforilate homo- sau heterodimerizează, poziționându-se într-o orientare antiparalelă prin interacțiunea domeniilor lor SH2 cu fosfotirosinele (Murray, 2007). Dimerii se translocă în nucleu prin intermediul importinelor nucleare și al semnalului de localizare nucleară (NLS), legându-se de promotorii genelor țintă și reglând transcrierea acestora (Bild, Turkson & Jove, 2002; Awasthi, Liongue & Ward, 2021). **Figura 2** prezintă circuitul STAT3 în celulă, ca exemplu de cale de semnalizare STAT.

2. STAT3

STAT3 este un membru cheie al familiei STAT, fiind implicat într-o gamă largă de procese celulare, precum dezvoltarea, creșterea și supraviețuirea. Reglarea STAT3 cuprinde o multitudine de evenimente care au loc la diferite niveluri și în diferite compartimente celulare, modulând activitatea fiziologică și patologică a STAT3. De exemplu, reglatorii negativi ai STAT3 includ proteinele tirozin fosfataze, familia SOCS și familia PIAS. Mai mulți membri ai familiei PTP, precum TC-PTP, SHP1, SHP2, PTPRD sau PTPRT sunt implicați în procesul de defosforilare a STAT3. În cancerul de sân triplu negativ, pierderea TC-PTP promovează creșterea celulelor tumorale prin stimularea atât a activității kinazelor Src, cât și a semnalizării STAT3 (Tang, Sui & Liu, 2023). Familia de proteine SOCS acționează prin atașarea la kinazele JAK sau la receptorii de citokine care au fost activați de JAK, blocând fosforilarea și activarea ulterioară a STAT3 (Tamiya et al., 2011). De asemenea, SOCS sunt implicate în degradarea proteazomală a STAT3 sau JAK (Neuwirt et al., 2009). Familia PIAS inhibă STAT3 prin legarea la dimeri, blocând astfel interacțiunea cu ADN și reglarea genelor din aval. PIAS3 s-a remarcat ca un important reglator negativ, iar nivelurile ridicate ale acestuia au fost corelate cu reducerea proliferării celulelor canceroase și creșterea apoptozei. Jiang et al. au descoperit că defectele SOCS3 și PIAS3 duc la hiperactivarea căii JAK/STAT în cancerul de sân în stadiu incipient (Jiang et al., 2020). Un alt exemplu, la nivel post-translațional, este fosforilarea STAT3 la Tyr 705, necesară pentru activarea sa și declanșată prin mai multe tipuri de semnalizare, cum ar fi tirozin kinazele non-receptor (precum Abl și Src), receptorii de citokine și receptorii tirozin kinazici (ca EGFR sau PDGFR) (Michels et al., 2013). Activarea STAT3 implică, de asemenea, fosforilarea la Ser 727, realizată de obicei de enzime precum protein kinaza activată de mitogeni (MAPK) sau kinaza 5 dependentă de ciclină (CDK5). Activarea

completă a STAT3 necesită ca ambele evenimente de fosforilare să aibă loc (Yang et al., 2020).

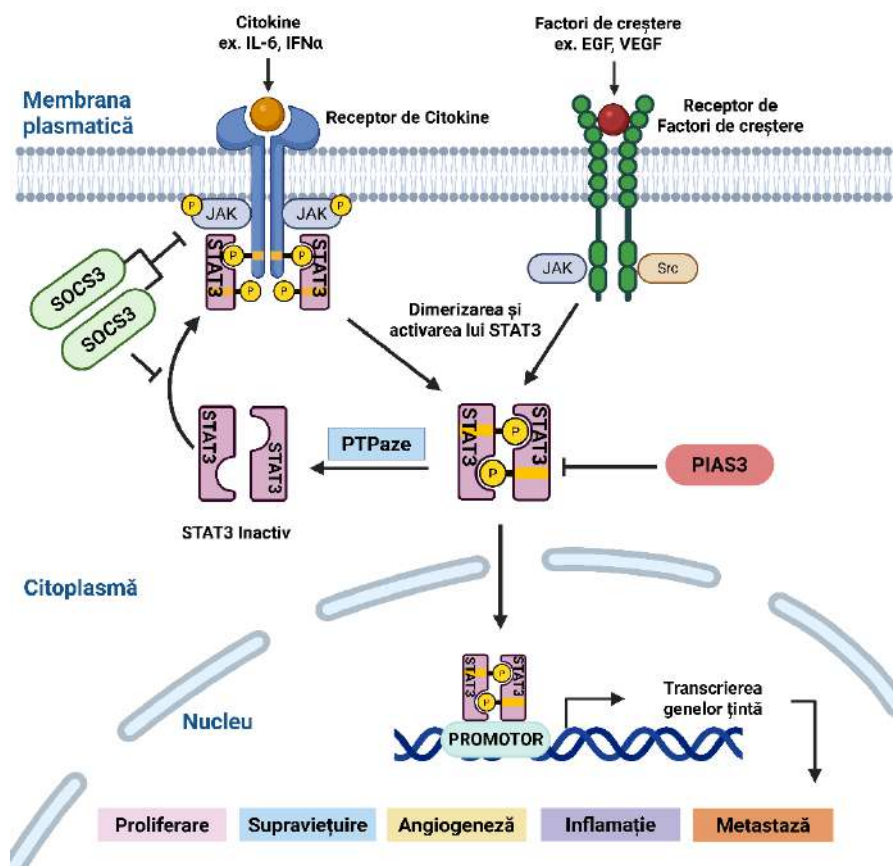


Figura 2: Calea de semnalizare STAT3, activată de citokine sau factori de creștere. Efectele biologice asociate bolii declanșate de reglarea STAT3 a genelor țintă și unele dintre mecanismele de reglare negativă pentru STAT3 sunt reprezentate schematic. Realizat în <https://BioRender.com> de către Puiu Adina-Gabriela (Vasilescu).

Implicarea lui STAT3 în Cancerul Ovarian (CO)

Activarea STAT3 în CO a fost corelată cu proliferarea sporită și persistentă, supraviețuirea, invazia, formarea vaselor de sânge și rezistența la chimioterapie prin controlul diverselor gene asociate cu aceste procese. Când este activat, STAT3 facilitează expresia mai multor gene critice pentru proliferarea celulară (cum ar fi *c-Myc*, *ciclina D1* sau *Pim-1*) și supraviețuirea (cum ar fi *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl-1* și *survivina*). Liniile celulare de CO cu niveluri ridicate de STAT3 fosforilat au prezentat o expresie crescută a acestor efectori, ceea ce a dus la creșterea necontrolată a celulelor și la inhibarea apoptozei (Huang et al., 2000; Wu et al., 2019). STAT3 joacă un rol esențial în procesul de angiogeneză. În celulele tumorale, STAT3 activ determină secreția unor cantități ridicate de factor de creștere endotelial vascular (VEGF) – un stimulator al semnalizării STAT3, care duce la formarea de

vase de sânge suplimentare. O buclă de feedback pozitivă care implică STAT3 și VEGF susține angiogeneza și determină progresia cancerului ovarian prin îmbogățirea vascularizării în micromediul tumoral (Anglesio et al., 2011). O enzimă cheie pentru invazia tumorală este metaloproteinaza matricială 9 (MMP9), care degradează matricea extracelulară. STAT3 fosforilat reglează direct MMP9, contribuind astfel la invazivitatea cancerului ovarian (Cheung, Leung & Wong, 2006; Jia et al., 2017). O etapă a procesului metastatic al CO este tranziția epitelial-mezenchimală (EMT), caracterizată prin niveluri scăzute de markeri epiteliali, precum E-caderina, și niveluri ridicate de markeri mezenchimali, precum N-caderina, vimentina și Snail (Davidson, Tropé & Reich, 2012). STAT3 hiperactivat a fost corelat cu expresia ridicată a vimentinei în celulele canceroase ovariene, sugerând că STAT3 este implicat în procesul EMT în cancerul ovarian (Yue et al., 2012). Această asociere între STAT3 și cancerul ovarian poziționează STAT3 în rândul țintelor terapeutice promițătoare pentru CO.

Inhibitori ai semnalizării bazate pe STAT3

Având în vedere rolul semnificativ al lui STAT3 ca biomarker în dezvoltarea și progresia afecțiunilor maligne, au fost dezvoltate diverse strategii de inhibare a semnalizării STAT3 pentru a crește speranța de viață și a încetini progresia bolii.

Inhibarea indirectă se referă la acele strategii care vizează și inhibă moleculele din amonte în calea de semnalizare JAK/STAT3, precum citokinele, receptorii citokinelor, proteinele JAK sau tirozin kinazele. Un exemplu este Siltuximab, un inhibitor al IL-6, care nu a prezentat efecte semnificative în tumorile în stadiu avansat, cum ar fi carcinomul colorectal, al capului și gâtului sau ovarian (Angevin et al., 2014). Ruxolitinib sau Tofacitinib sunt inhibitori JAK, dar chiar dacă sunt deja aprobați de FDA, aceștia declanșează efecte secundare sistemice (Qian, Xue & Shannon, 2022; Verstovsek et al., 2012). Erlotinib, un inhibitor al EGFR, și Dasatinib, un inhibitor al Src, trebuie administrate împreună cu un agent chimioterapeutic pentru a prezenta efectele scontate, o strategie care crește toxicitatea, cu afecțiuni sistemice ale organismului (Nagaraj, Washington & Merchant, 2011). **Inhibarea directă** are loc prin țintirea diferitelor domenii ale STAT3 pentru a-i preveni activitatea. Au fost dezvoltate molecule care ținesc domeniul SH2, care este implicat în interacțiunea STAT3 cu receptorii și, de asemenea, în dimerizarea STAT3. Peptidomimeticele și moleculele mici sintetice au demonstrat efecte promițătoare în cazul cancerului (Turkson et al., 2001; Schust et al., 2006). Cu toate acestea, ele s-au confruntat cu limitări precum probleme de permeabilitate, afinitate scăzută și efecte nedorite. Strategiile

bazate pe acizi nucleici, cum ar fi oligonucleotidele antisens (ASO), care sunt concepute pentru a se lega și a degrada ARNm al STAT3, se confruntă cu limitări precum instabilitatea și specificitatea redusă, în ciuda potențialului lor (Roth, 2005; Zhang et al., 2024).

3. OLIGONUCLEOTIDELE CA INHIBITORI EFICIENȚI AI DOMENIULUI DE LEGARE ADN AL LUI STAT3

Odată activat și translocat în nucleu, STAT3 reglează genele țintă prin recunoașterea și legarea prin intermediul domeniului său de legare la ADN (DBD) a elementelor de răspuns specifice (cum ar fi GAS) situate în regiunea promotorului acestor gene. Au fost dezvoltate mai multe molecule inhibitoare, oligonucleotide momeală (ODN-decoy), pentru a ținti acest domeniu, cu scopul de a bloca funcția STAT3 de stimulare a procesului canceros și de a promova apoptoza și regresia tumorală. Prima generație de ODN a fost reprezentată de o moleculă lineară, dublu-catenară, de 15 pb. Aceasta a fost utilizată la scară largă pe linii celulare provenite din tumori solide și a dat rezultate promițătoare. A inhibat proliferarea și progresia ciclului celular, promovând apoptoza și reducând expresia genelor țintă, precum *Cyclin D1*, *c-myc* și *Bcl-xL* în celule de gliom (Gu et al., 2008). A indus apoptoza și a redus creșterea celulară și a afectat interacțiunea STAT3 cu importina, împiedicând translocarea STAT3 în nucleul celulelor canceroase colorectale (Souissi et al., 2011). După ce a demonstrat efecte încurajatoare pe modele animale (Zhang et al., 2007; Sen et al., 2009), studiile clinice au stabilit că, la administrarea sistemică, molecula era instabilă și se degrada rapid sub acțiunea nucleazelor (Sen et al., 2012).

Astfel, a fost dezvoltată o nouă clasă de molecule dublu-catenare bazate pe ADN, numite **minicercuri ADN**, dar această strategie nu a fost explorată suficient. O metodă de obținere a acestor molecule circulare de ADN a fost propusă de Thibault et al. (2017), inhibând factorul de transcriere NF-κB, datorită prezenței motivelor κB în secvența sa, care sunt recunoscute de NF-κB. S-a demonstrat că aceasta reduce semnificativ transcrierea dependentă de NF-κB în celulele HEK293. Acest studiu oferă oportunități pentru proiectarea minicercurilor ca instrumente noi de țintire și capturare bazate pe acizi nucleici.

Având în vedere toate informațiile prezentate până acum, și anume importanța proteinei STAT3, precum și implicațiile sale în inițierea și progresia cancerului ovarian și strategia promițătoare de utilizare a minicercurilor de ADN ca potențiali inhibitori pentru factori de transcriere precum STAT3, am ales să utilizez minicercul ADN împotriva STAT3 ca agent terapeutic în celulele de cancer ovarian ca obiectiv principal al acestei teze de doctorat.

III. PARTE EXPERIMENTALĂ

1. MATERIALE ȘI METODE

Experimentele din această teză au fost efectuate pe linia celulară de carcinom ovarian SKOV3, a cincea ca nivel de expresie STAT3 (The Human Protein Atlas, 2025). Oligonucleotidele și splinturile necesare pentru producerea minicercurilor anti-STAT3 și mock (mcDNA) au fost achiziționate de la GenScript Biotech (Olanda). Circularizarea și ligarea moleculelor monocatenare au fost realizate utilizând tehnica „Ciclizarea enzimatică cu ADN ligază T4 a oligonucleotidelor, asistată de splint” (Diegelman & Kool, 2000). Moleculele duclu-catenare au fost obținute prin izolarea din gelul de agaroză a moleculelor monocatenare circulare, urmată de hibridizarea acestora. Validarea conformației circulare dublu-catenare s-a realizat prin digestie enzimatică.

Celulele SKOV3 au fost transfectate cu minicercurile obținute utilizând Lipofectamină 3000 într-un raport ADN:Lipofectamină de 1:1. Valoarea IC_{50} a compusului a fost evaluată prin testul MTS, după tratarea cu concentrații seriale de minicercuri anti-STAT3 mcDNA și respectiv mock. Celulele SKOV3 tratate cu anti-STAT3 mcDNA, mock mcDNA sau doar Lipofectamină au fost supuse tehnicilor de citometrie în flux, PCR cantitativ și Western blot pentru a evalua efectele compusului asupra proliferării, apoptozei și reglării unor gene țintă ale STAT3, *MCL1* și *PIMI*. Au fost aplicate testele statistice corespunzătoare.

2. REZULTATE

Proiectarea și principiul obținerii minicercurilor

Am utilizat oligonucleotide lineare 5'-fosforilate (cu lungimea de 95 nucleotide) conținând trei motive de tip GAS echidistante, cu secvența 5' TTCCCGTAA 3' (demonstrat că leagă STAT3 cu afinitate ridicată (Yang et al., 2003)), care servesc drept situsuri de recunoaștere pentru DBD al STAT3. Fiecare catenă complementară a fost circularizată individual folosind metoda „ciclizării enzimatice asistate de splint” (Diegelman & Kool, 2000), catalizată de ADN ligaza T4.

Această metodă utilizează un fragment scurt de ADN monocatenar („splint”) care completează regiunile terminale ale oligonucleotidului. În timpul reacției, capetele oligonucleotidului sunt aduse împreună prin hibridizare cu splintul, urmată de o etapă de

ligare lentă. Menținerea unei viteze lente de ligare crește eficiența și minimizează formarea de multimerii nedoriti. După circularizarea monocatenară, cercurile au fost izolate din gel de agaroză și hibridizate cu complementarele lor pentru a produce minicercuri ADN anti-STAT3 dublu-catenar (anti-STAT3 mcDNA). Un minicerc control negativ (mock mcDNA) cu motive de tip GAS modificate, care nu sunt recunoscute de DBD al STAT3, a fost generat în același mod (Vasilescu et al., 2025). **Figura 3** oferă o imagine de ansamblu asupra modului de producție a minicercurilor.

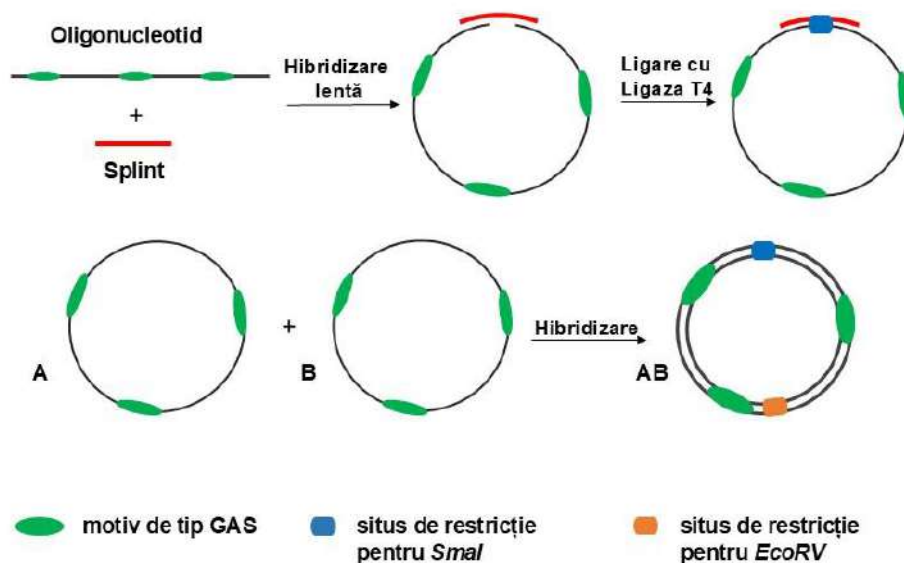


Figura 3: Principiul obținerii minicercurilor dublu-catenare. Reprezentare schematică a procedurii de circularizare a oligonucleotidelor prin tehnica ligării enzimice asistate de splint. Moleculele mcDNA sunt create prin hibridizarea a două cercuri complementare monocatenare. Situsul de restricție *SmaI* este folosit pentru confirmarea circularizării, în timp ce digestia cu *EcoRV* validează natura dublu-catenară a minicercurilor. Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

Producerea minicercurilor ADN dublu-catenare și validarea lor prin digestie enzimatică

Pentru a crea minicercurile anti-STAT3 și mock dublu-catenare, am circularizat oligonucleotidele specifice folosind splinturi distincte, generând un situs de restricție *SmaI* unic, așa cum s-a descris anterior. Purificarea cercurilor complementare monocatenare a fost urmată de hibridizarea acestora. Această etapă a format moleculele dublu-catenare finale, creând situsul de restricție *EcoRV*, diametral opus situsului de restricție pentru *SmaI*. În continuare, am validat circularizarea folosind restricția cu *SmaI*, în timp ce prezența situsului *EcoRV* a asigurat hibridizarea completă a celor două cercuri complementare monocatenare.

Așa cum se prezintă în **Figura 4**, molecula finală adoptă o configurație circulară, dublu-catenară. După digestia cu *SmaI* și *EcoRV* (banda 4), produsul principal, care este banda cea mai groasă, se deplasează semnificativ mai jos decât oligonucleotidul linear de 95 de nucleotide. Prezența benzii (sau benzilor) superioare se datorează digestiei incomplete. Digestia cu *SmaI* (banda 5) produce două benzi: banda superioară indică molecula circulară dublu-catenară completă, în timp ce banda inferioară (~100 bp) reprezintă fragmentul linear. Acest rezultat se datorează digestiei parțiale. Digestia cu *EcoRV* (banda 6) generează o bandă unică în apropierea valorii de 100 bp, distinctă de produsul circular final, asemănătoare cu banda inferioară observată după digestia cu *SmaI*. Am utilizat minicercul dublu-catenar purificat și hibridizat în prealabil drept control tehnic negativ, incubându-l fără enzime de restricție. Acest control a verificat circularitatea și configurația dublu-catenară a moleculelor sintetizate, prezentând o bandă unică, similară cu produsul circular final.

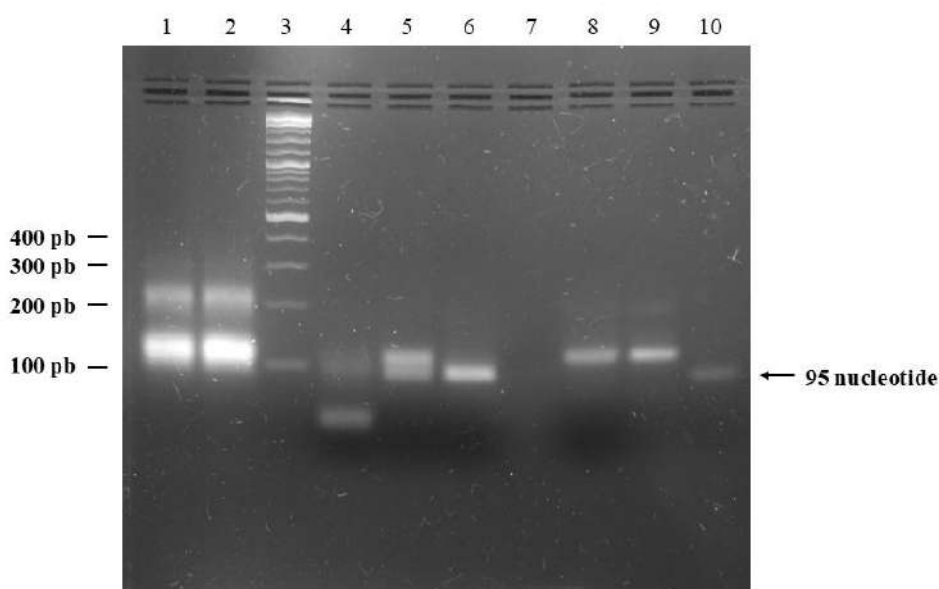


Figura 4: Validarea minicercurilor dublu-catenare anti-STAT3 în gel de agaroză. Godeul 1: minicerc monocatenar A, rezultat din reacția de ligare; Godeul 2: minicerc monocatenar B, complementar minicercului A, rezultat din reacția de ligare; Godeul 3: Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder; Godeul 4: minicerc dublu-catenar obținut după purificare din gel și hibridizare, digerat cu enzimele de restricție *SmaI* și *EcoRV*; Godeul 5: minicerc dublu-catenar obținut după purificare și hibridizare, digerat cu *SmaI*; Godeul 6: minicerc dublu-catenar obținut după purificare și hibridizare, digerat cu *EcoRV*; Godeul 7: gol; Godeul 8: control negativ al minicercului dublu-catenar obținut după purificare și hibridizare, fără enzime de restricție; Godeul 9: minicerc dublu-catenar anti-STAT3, după purificare și hibridizare; Godeul 10: precursor oligonucleotidic linear corespunzător minicercului monocatenar A. Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

Anti-STAT3 mcDNA interacționează specific cu proteina STAT3

După obținerea și validarea cu succes a minicercurilor, am dorit să evaluăm capacitatea anti-STAT3 mcDNA de a interacționa cu proteina STAT3. Am efectuat un test de mobilitate electroforetică (EMSA), utilizând o proteină STAT3 obținută în laborator. Pentru acest test, am utilizat diferite rapoarte molare de ADN: proteină.

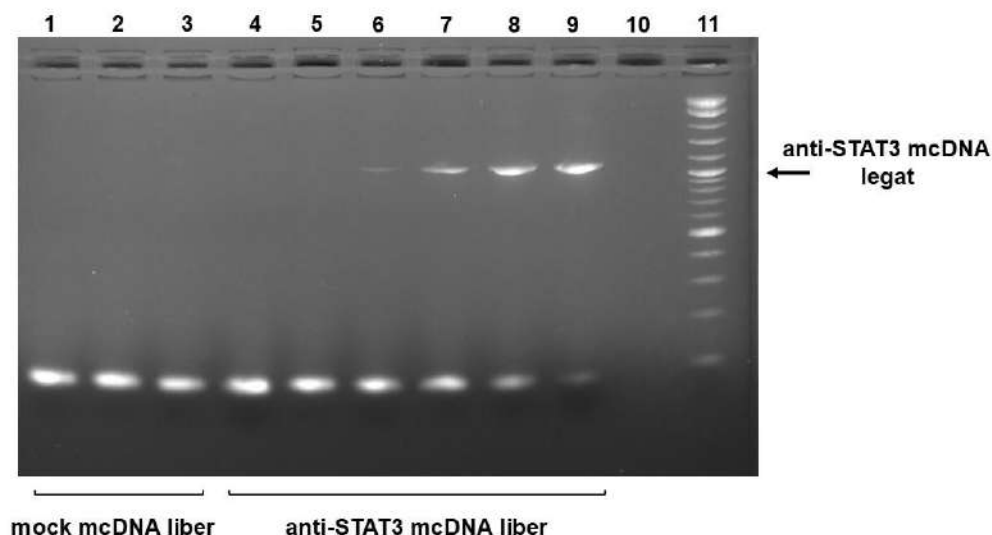


Figura 5: Interacția dintre anti-STAT3 mcDNA și proteina STAT3, evidențiată prin EMSA și vizualizată în gel de agaroză. Pentru interacție au fost utilizate diferite rapoarte molare ADN: proteină. Godeul 1: control negativ pentru mock (fără proteină); Godeurile 2, 3: mock mcDNA: STAT3 în rapoarte de 1:3 și 1:4; Godeul 4: control negativ pentru anti-STAT3 mcDNA (fără proteină); Godeurile 5, 6, 7, 8, 9: anti-STAT3 mcDNA: STAT3 în rapoarte de 1:0,75, 1:1,5, 1:2, 1:3 și 1:4; Godeul 10: gol; Godeul 11: Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder. Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

Gelul de agaroză din **Figura 5** prezintă două tipuri de benzi: (i) benzi care migrează în jurul valorii de 100 pb, corespunzând formei libere a minicercurilor, cea care nu a interacționat cu proteina sau a cărei interacțiune a fost extrem de slabă, astfel încât molecula de ADN nu a fost întârziată; (ii) benzi cu mobilitate redusă semnificativ (cu mult peste zona de 100 pb), în concordanță cu complexele STAT3–minicerc cu greutate moleculară mare; deplasarea pronunțată poate reflecta legarea multimerică a dimerilor STAT3 sau agregarea parțială a complexului proteină–ADN. Puterea interacțiunii și masa proteinei care interacționează dictează gradul de întârziere a moleculei de ADN în timpul migrării. La un raport molar de 1:0,75 (banda 5), pare să nu existe nicio interacție între anti-STAT3 mcDNA și proteina STAT3, fiind prezentă doar forma liberă. Același lucru este valabil și pentru controlul negativ (banda 4, fără proteină). În intervalul de raport molar de la 1:1,5 la 1:4, se

poate observa o creștere a formei legate și o scădere a formei libere a anti-STAT3 mcDNA. Din aceste rezultate, se pare că, pentru o interacțiune reușită, proteina trebuie să fie în exces molar față de ADN. Mock mcDNA incubat cu proteina în rapoarte molare de 1:3 și 1:4 prezintă același model de migrare ca și controlul negativ de mock (fără proteină), fără nicio schimbare în migrarea moleculei de ADN. Acest lucru sugerează că mock mcDNA, datorită motivelor de tip GAS modificate pe care le conține, nu interacționează cu proteina STAT3. Aceste rezultate indică faptul că anti-STAT3 mcDNA interacționează în mod specific cu proteina STAT3, datorită motivelor sale de tip GAS.

Tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA scade viabilitatea celulelor SKOV3 de cancer ovarian

Celulele SKOV3 au fost transfectate fie cu anti-STAT3 mcDNA, fie cu mock mcDNA (control negativ pentru specificitate) în concentrații seriale: 0 nM, 1,56 nM, 3,12 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM și 100 nM. Au fost efectuate triplicate tehnice pentru fiecare condiție. Controalele tehnice negative au fost reprezentate de celulele netratate și celulele tratate numai cu Lipofectamină 3000 în concentrații echivalente de ADN de 25 nM, 50 nM și 100 nM. Controlul tehnic pozitiv a fost reprezentat de o incubare de 15 minute cu Triton X-100 0,02%, înainte de adăugarea reactivului MTS.

După efectuarea testului MTS, am obținut o valoare IC₅₀ de 13,48 nM pentru anti-STAT3 mcDNA. **Figura 6A** ilustrează faptul că viabilitatea celulară a fost redusă într-o manieră dependentă de doză în comparație cu celulele tratate numai cu Lipofectamină. În schimb, tratamentul cu mock mcDNA nu a înregistrat niciun efect notabil asupra viabilității celulare, indiferent de concentrație.

Am dorit să evaluăm efectul toxic al Lipofectaminei la cele mai mari concentrații aplicate (25 nM, 50 nM și 100 nM) și să determinăm dacă efectul observat se datorează exclusiv tratamentului cu compusul ADN sau dacă intervine și efectul Lipofectaminei. În acest scop, am comparat celulele netratate cu celulele tratate numai cu Lipofectamină, celulele tratate cu anti-STAT3 mcDNA la 25 nM, 50 nM și 100 nM și celulele tratate cu Triton X-100 (**Figura 6B**). Am observat o diferență semnificativă statistic în viabilitatea celulelor între tratamentul numai cu Lipofectamină și tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA în cazul tuturor celor trei concentrații. În concluzie, chiar dacă există toxicitate dată de Lipofectamină, se poate considera că în principal efectele observate se datorează tratamentului cu minicerc. Mai mult, am observat un efect semnificativ statistic asupra

celulelor tratate numai cu Lipofectamină la concentrații echivalente de ADN de 50 nM și 100 nM, în comparație cu celulele netratate. De asemenea, în ceea ce privește celulele tratate numai cu Lipofectamină la o concentrație echivalentă de ADN de 25 nM, nu s-a observat niciun efect toxic semnificativ, în comparație cu celulele netratate. Astfel, scăderea viabilității celulare înregistrată la IC₅₀ a fost exclusiv rezultatul tratamentului cu anti-STAT3 mcDNA.

Aceste constatări, împreună cu impactul minim al tratamentului cu mock mcDNA, validează acțiunea inhibitoare țintită a minicercului anti-STAT3 (Vasilescu et al., 2025).

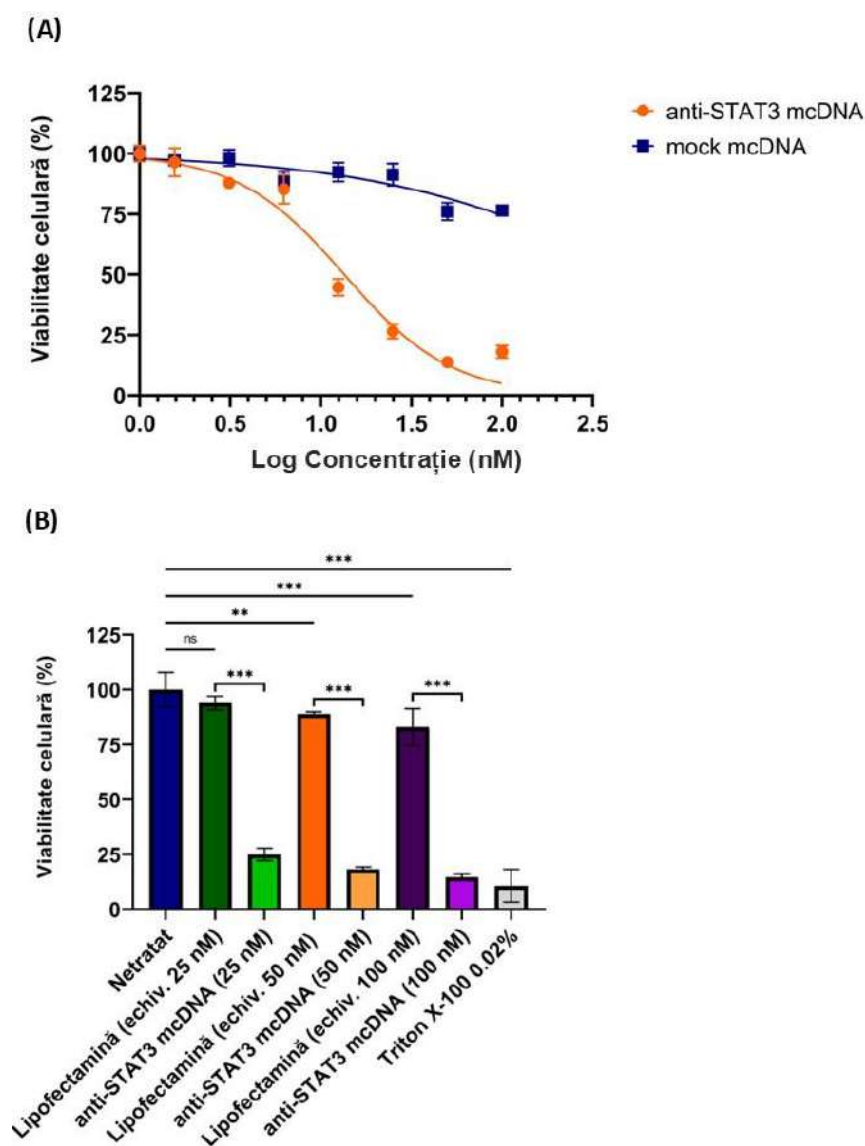


Figura 6: Impactul de inhibiție al anti-STAT3 mcDNA asupra celulelor canceroase ovariene SKOV3, evaluat utilizând testul MTS. **(A)** Efectele tratamentelor cu anti-STAT3 mcDNA și mock mcDNA asupra celulelor SKOV3, ilustrate prin curbe doze-răspuns de inhibiție. Punctele indică procentul viabilitate medie celulară normalizat la probele numai cu Lipofectamină la concentrațiile de tratament testate: 0 nM, 1,56 nM, 3,12 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM și 100 nM. **(B)** Evaluarea efectului toxic al Lipofectaminei 3000

administrată celulelor SKOV3 la concentrații echivalente de ADN (25 nM, 50 nM și 100 nM), în comparație cu condițiile tratate cu anti-STAT3 mcDNA, netratate și tratate cu Triton X-100. Semnificația statistică a fost evaluată utilizând one-way ANOVA. ns – nesemnificativ ($p \geq 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barele de eroare reprezintă $\pm$ SD. Sunt prezentate rezultatele dintr-un experiment reprezentativ din trei efectuate ($n=3$). Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

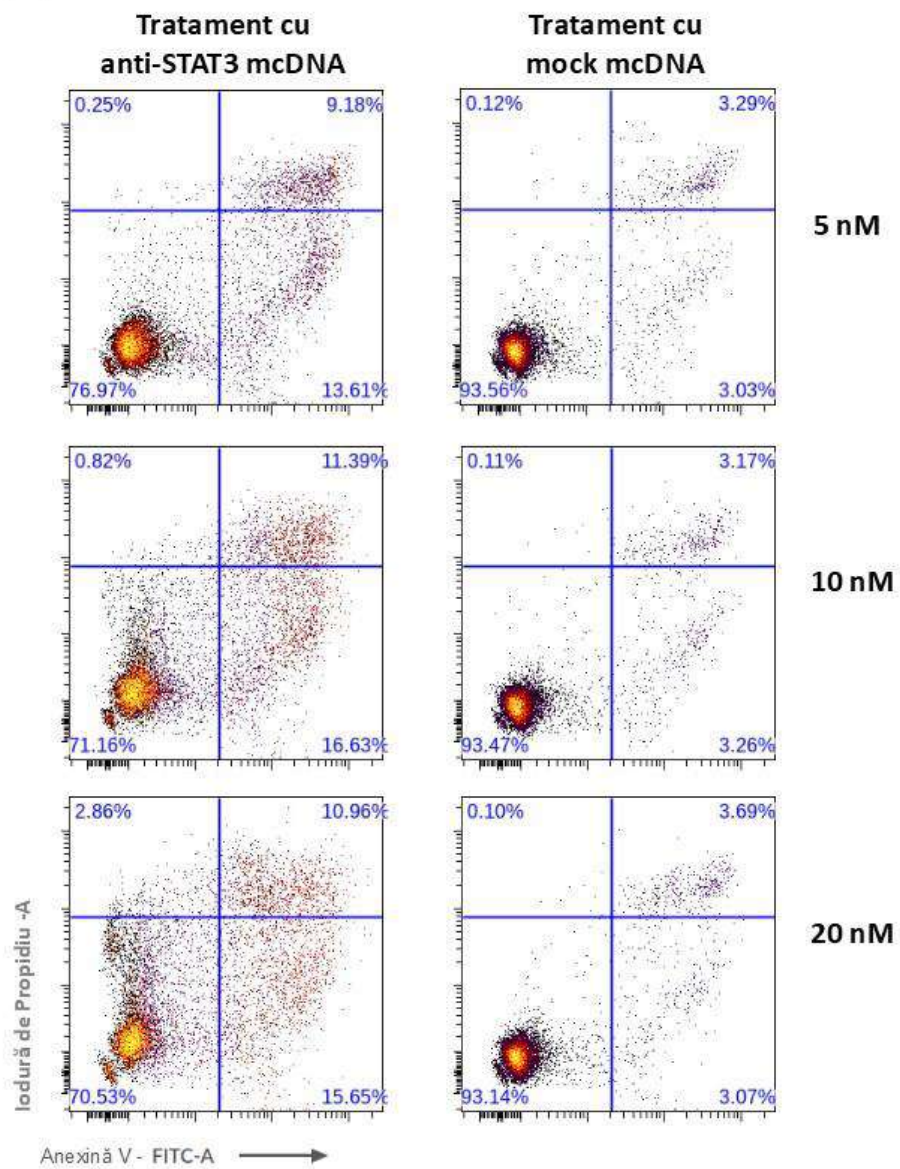
Tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA induce apoptoză și necroză în celule SKOV3

Având în vedere că rezultatele MTS indică faptul că tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA a redus viabilitatea celulelor SKOV3, am examinat efectele acestui compus în ceea ce privește apoptoza și necroza celulelor canceroase ovariene.

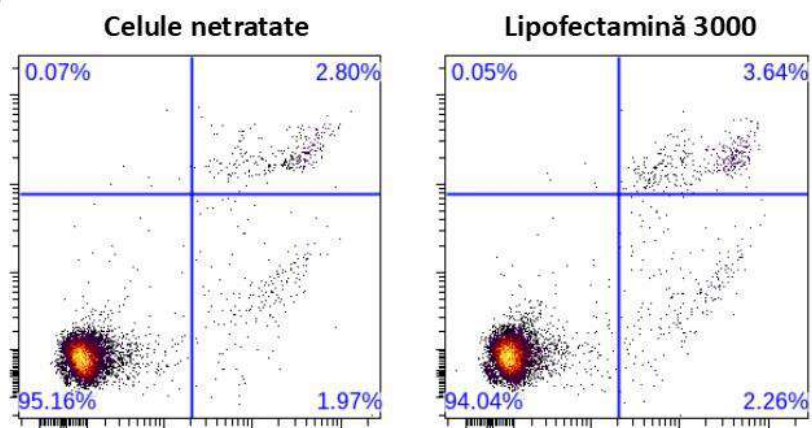
Am transfectat celulele cu trei concentrații diferite de minicerc anti-STAT3 sau minicerc mock: 5 nM, 10 nM și 20 nM, pentru a observa dacă există o dependență de doză. Protocolul de citometrie în flux a fost utilizat prin marcarea cu Anexină V-FITC și Iodură de Propidiu (markeri pentru apoptoză și respectiv necroză). Așa cum arată **Figura 7A**, tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA a dus la o creștere a procentului de celule apoptotice (cadranul din dreapta jos, Anexină V+, IP-) și necrotice (cadranul din dreapta sus, Anexină V+, IP+) pentru toate cele trei concentrații aplicate, în timp ce tratamentul cu mock mcDNA (care este controlul negativ pentru specificitate, conform rezultatelor anterioare) nu a avut aproape niciun efect asupra apoptozei sau necrozei celulare. De asemenea, efectul mock mcDNA este similar cu efectul tratamentului numai cu Lipofectamină (control tehnic negativ, concentrație echivalentă de ADN de 20 nM) și similar cu procente de necroză și apoptoză observate în cazul celulelor netratate (control tehnic negativ).

Chiar și la o concentrație de 5 nM (mai mică decât jumătate din IC_{50}), s-a observat un efect pronunțat, rezultând 76,97% celule viabile, 13,61% celule apoptotice și 9,18% celule necrotice. În cazul tratamentului cu anti-STAT3 mcDNA, se observă o ușoară creștere a apoptozei și a necrozei și o scădere a celulelor viabile între tratamentele cu 5 nM și 10 nM. Cu toate acestea, nu am observat aceeași tendință de creștere a apoptozei și a necrozei între 10 nM și 20 nM, ceea ce indică faptul că efectul pro-apoptotic se stabilizează între 10 nM și 20 nM. **Figura 7B** prezintă controalele pentru această analiză: celule netratate, celule tratate numai cu Lipofectamină, Cisplatină (control tehnic pozitiv pentru apoptoză) și Triton X-100 (control tehnic pozitiv pentru necroză). În concluzie, inhibarea activității STAT3 prin tratamentul cu compusul minicerc promovează apoptoza și necroza în celulele canceroase ovariene SKOV3 în funcție de doză, în intervalul 0 nM - 10 nM, stabilizându-se la concentrații mai mari.

(A)



(B)



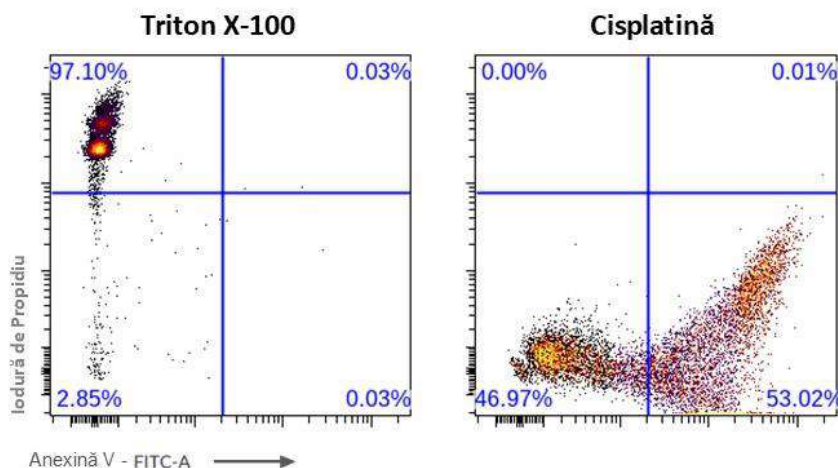


Figura 7: Impactul tratamentului cu anti-STAT3 mcDNA asupra apoptozei și necrozei în celulele canceroase ovariene SKOV3. **(A)** Proporția celulelor apoptotice și necrotice după tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA în comparație cu mock în diferite concentrații (5 nM, 10 nM și 20 nM). Cadranul din dreapta jos reprezintă celulele apoptotice (Anexină V+, IP-), în timp ce cadranul din dreapta sus reprezintă celulele necrotice (Anexină V+, IP+). **(B)** Controalele negative (probe netratate și tratate cu Lipofectamină 3000) și pozitive (probe tratate cu Triton X-100 și Cisplatină) pentru apoptoză și necroză. Aceste date prezintă rezultatele unui experiment reprezentativ. Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

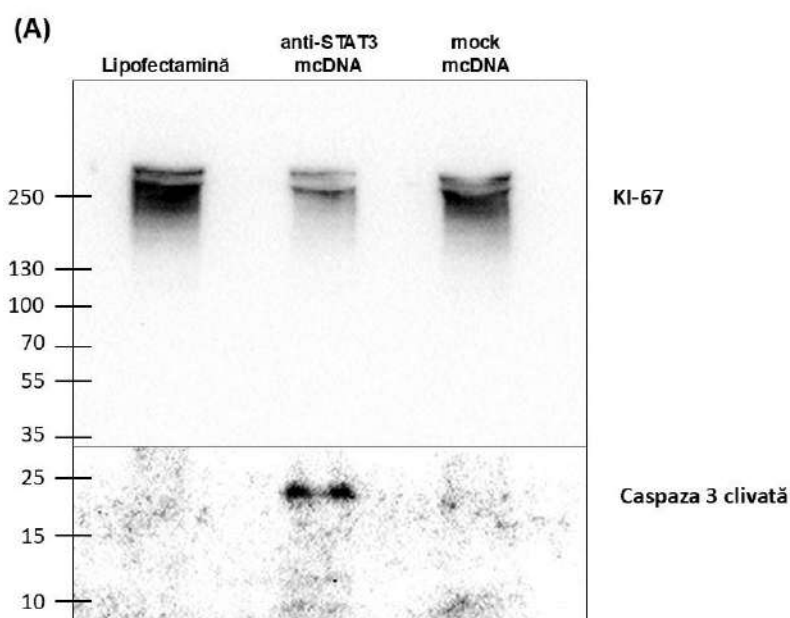
Anti-STAT3 mcDNA reduce proliferarea celulelor SKOV3 de cancer ovarian

Pentru a identifica în continuare efectele moleculare pe care minicercurile noastre le declanșează prin inhibarea STAT3 în celulele canceroase ovariene, am explorat procesul de proliferare. Am utilizat lizate celulare de SKOV3 pentru a evalua nivelurile proteice ale Ki-67, caspaza 3 clivată, STAT3, STAT3 fosforilată la Tyr705 și GAPDH, utilizând tehnica Western blot. Concentrația de tratament a fost de 10 nM. Așa cum arată **Figura 8A**, în cazul tratamentului celulelor SKOV3 cu anti-STAT3 mcDNA, nivelurile de expresie ale Ki-67 (marker de proliferare), normalizate la GAPDH (control de încărcare), s-au dovedit a fi reduse de peste două ori în comparație cu cele ale celulelor tratate numai cu Lipofectamină (control tehnic negativ) sau cu celulele tratate cu mock mcDNA (control experimental negativ). Această diferență este semnificativă din punct de vedere statistic. Cu toate acestea, nivelurile de expresie Ki-67 între celulele tratate cu Lipofectamină și cele tratate cu mock sunt similare (**Figura 8C**). Mai mult, caspaza 3 clivată (**Figura 8A**), un marker al apoptozei, a fost detectată numai în celulele tratate cu anti-STAT3 mcDNA. Datorită nivelurilor sale scăzute de expresie, aceasta a fost evaluată calitativ, mai degrabă decât cantitativ. Aceste rezultate susțin concluziile citometriei în flux, care indică faptul că minicercul nostru este

capabil să inducă apoptoza celulelor canceroase ovariene. De asemenea, tratamentul cu această moleculă inhibitoare afectează proliferarea celulelor canceroase ovariene.

Deși s-a observat o ușoară reducere a expresiei STAT3 în celulele tratate cu anti-STAT3 mcDNA, în comparație cu celulele tratate cu Lipofectamină sau mock mcDNA, această reducere nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic (**Figura 8C**). În cazul STAT3 fosforilat, există o diferență considerabilă (**Figurile 8B și C**). După tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA, nivelurile de expresie ale fosfo-STAT3 (Tyr705) au fost semnificativ mai scăzute în comparație cu celulele tratate numai cu Lipofectamină sau cu mock mcDNA. Între tratamentul cu Lipofectamină și cel cu mock, nivelurile de fosfo-STAT3 sunt comparabile și sugerează că proteina STAT3 activă este prezentă. În contrast, nivelurile scăzute de fosfo-STAT3 observate în celulele tratate cu minicerc anti-STAT3 arată că există mai puțin STAT3 activ sau că STAT3 nu mai este activat, sugerând o perturbare a semnalizării în calea JAK/STAT3.

În concluzie, analiza expresiei proteice întărește rezultatele MTS și de citometrie în flux, arătând că tratamentul celulelor SKOV3 cu anti-STAT3 mcDNA induce niveluri ridicate de apoptoză, inhibând în același timp semnalizarea STAT3 și ducând la reducerea proliferării celulare.



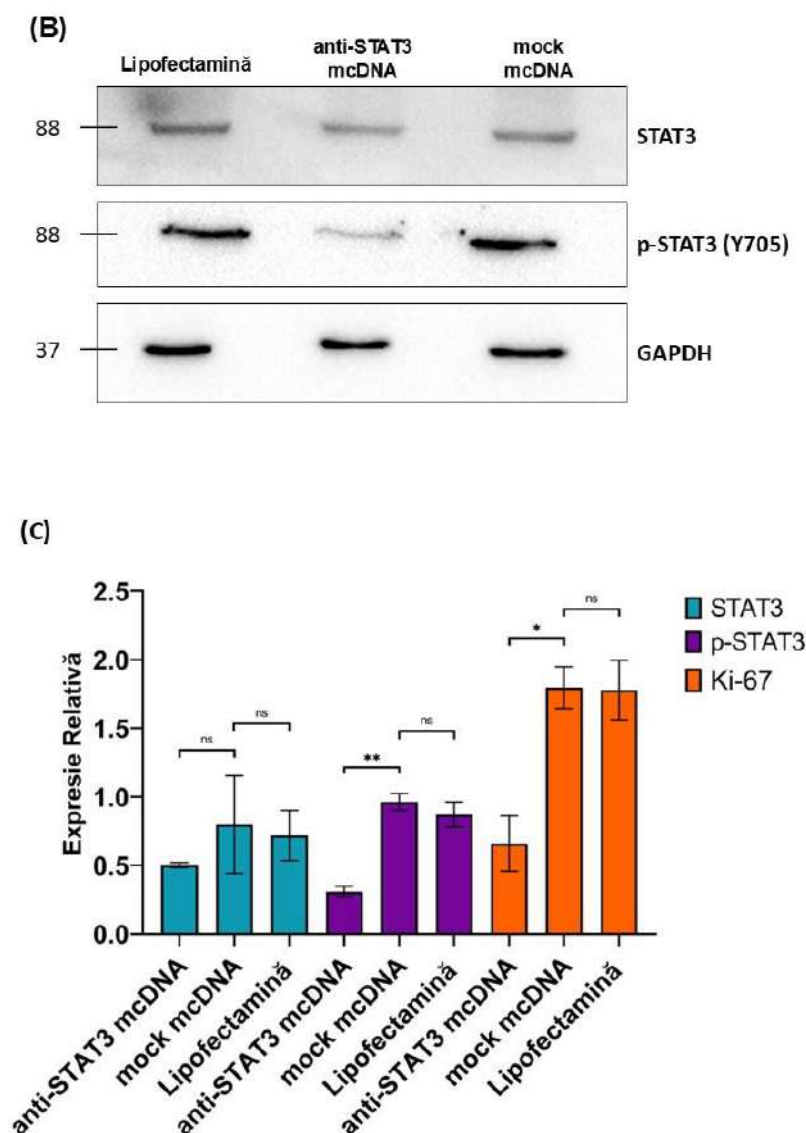


Figura 8: Analiza lizatelor celulare de SKOV3 utilizând tehnica Western blot. (A) În celulele SKOV3, nivelurile de expresie ale Ki-67 (>250 kDa) și caspaza 3 clivată (~20 kDa) au fost analizate după tratamentul cu Lipofectamină 3000 (concentrație echivalentă de ADN), anti-STAT3 mcDNA și mock mcDNA la o concentrație de 10 nM. Caspaza 3 clivată a fost vizualizată utilizând SuperSignal™. Scara utilizată pentru vizualizarea și validarea acestor proteine este indicată schematic în partea stângă (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 până la 250 kDa); (B) Nivelurile de expresie proteică ale STAT3, p-STAT3 (Y705) și GAPDH, determinate în celulele SKOV3 după condițiile de tratament menționate mai sus. Masele moleculare corespunzătoare sunt indicate în stânga; (C) Cuantificarea nivelurilor de expresie ale STAT3, p-STAT3 și Ki-67, normalizate la GAPDH drept control de încărcare, în fiecare condiție de tratament. Caspaza-3 clivată apare ca fiind prezentă sau absentă din cauza nivelurilor sale scăzute de expresie. Semnificația statistică a fost evaluată utilizând one-tailed unpaired *t*-test. ns – nesemnificativ ($p \geq 0,05$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barele de eroare indică $\pm$ SEM. Figura prezintă un experiment reprezentativ ($n=3$). Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

Minicercul anti-STAT3 reduce expresia genelor pro-supraviețuire și anti-apoptoză

Având în vedere funcția de reglator a lui STAT3 pentru numeroase gene implicate în creșterea, proliferarea și supraviețuirea celulelor canceroase, am dorit să investigăm mai în detaliu dacă expresia anumitor gene din avalul semnalizării STAT3 este afectată odată ce activitatea STAT3 este inhibată de tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA. Argumentul pentru aceasta este că inhibarea genelor din aval ar putea fi un motiv pentru fenotipurile detectate prin MTS și citometria în flux în celulele tratate cu anti-STAT3 mcDNA. În acest scop, două gene reglate de STAT3, *MCL1* și *PIM1*, cu roluri cunoscute în inhibarea apoptozei și promovarea supraviețuirii celulare (Shirogane et al., 1999; Kanda et al., 2004), au fost selectate pentru analiza expresiei prin RT-qPCR. Am tratat celulele SKOV3 cu 10 nM minicerc anti-STAT3 sau minicerc mock. Pentru aceste experimente, am utilizat duplicate tehnice. Așa cum ilustrează **Figura 9**, ambele gene au prezentat o scădere semnificativă a expresiei în celulele tratate cu anti-STAT3 mcDNA, în comparație cu tratamentul cu mock mcDNA (control experimental negativ). Mai precis, nivelurile de *MCL1* au scăzut cu aproximativ 50%, în timp ce nivelurile de *PIM1* au scăzut cu aproximativ 75%, conform determinărilor realizate prin „analiza cantitativă comparativă”. Aceste descoperiri la nivel molecular susțin observațiile anterioare de scădere a viabilității celulelor canceroase ovariene și creșterea apoptozei după tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA, astfel creând o legătură mecanistică între inhibarea STAT3 și afectarea funcției celulare.

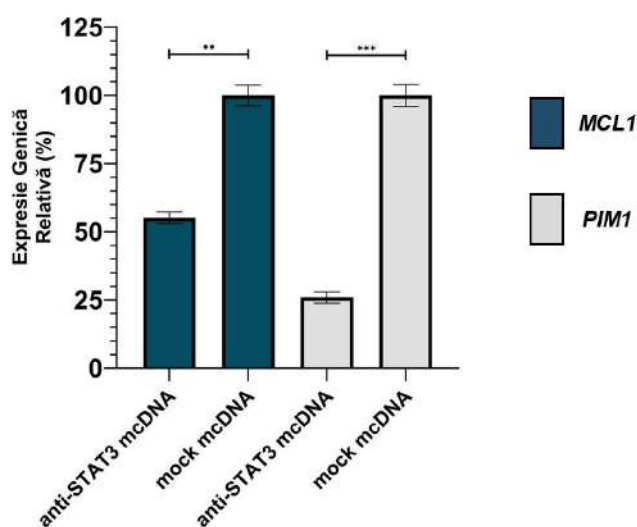
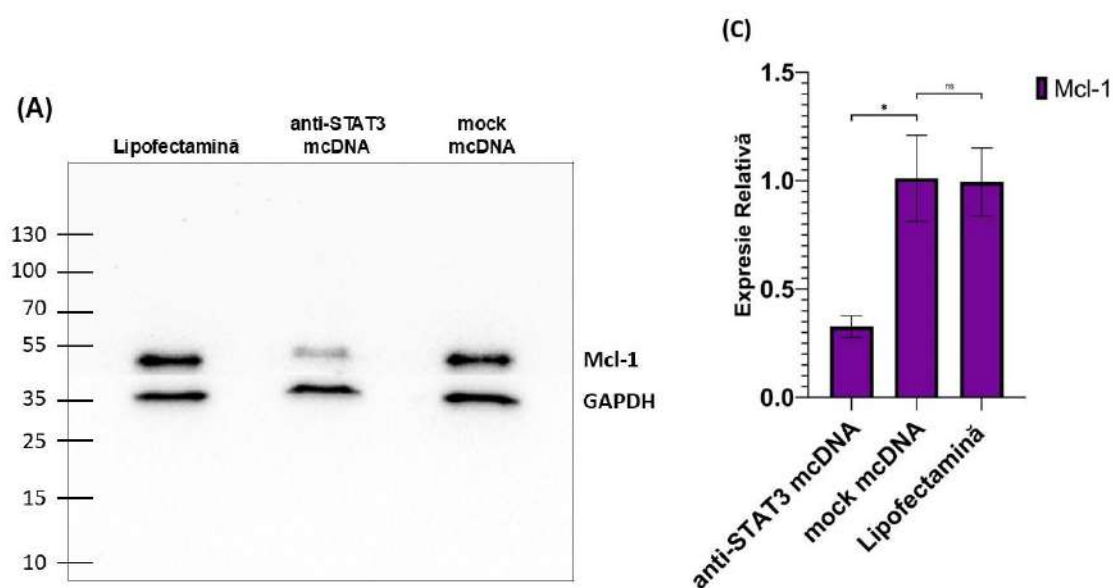


Figura 9: Cuantificarea expresiei genice relative prin RT-qPCR pentru genele *MCL1* și *PIM1*. Celulele au fost supuse tratamentului cu anti-STAT3 sau mock mcDNA la o concentrație de 10 nM, iar datele au fost normalizate la nivelurile de expresie genică de GAPDH. Pentru evaluarea semnificației statistice s-a utilizat one-tailed unpaired *t*-test. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barele de eroare indică $\pm$ SD. Datele prezintă rezultatele unui

experiment reprezentativ dintre cele trei efectuate (n=3). Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

După rezultatele qPCR despre nivelurilor de expresie genică, am dorit să investigăm mai în detaliu ce se întâmplă cu nivelurile proteinelor corespunzătoare atunci când celulele sunt tratate cu minicercurile. Astfel, am analizat lizatele celulare de SKOV3 prin Western blot, la tratamentul cu o concentrație de 10 nM. După cum arată **Figura 10A**, după tratamentul cu anti-STAT3 mcDNA, nivelurile de expresie ale proteinei Mcl-1 au fost reduse semnificativ, de peste două ori (**Figura 10C**) în comparație cu tratamentul cu mock mcDNA (control experimental negativ), în concordanță cu rezultatele analizei ARNm. Celulele tratate cu mock mcDNA au prezentat niveluri de Mcl-1 similare cu cele tratate cu Lipofectamină (control tehnic negativ). În ceea ce privește nivelul de expresie al Pim-1, având în vedere cantitatea redusă de proteină, cuantificarea nu a fost posibilă. În **Figura 10B**, săgețile negre marchează benzile greu detectabile corespunzătoare proteinei Pim-1. Nu s-a observat nicio bandă în condiția de tratament cu anti-STAT3 mcDNA. Datele de RT-qPCR și Western blot sugerează faptul că anti-STAT3 mcDNA este capabil să determine scăderea expresiei genelor anti-apoptotice și pro-supraviețuire reglate de STAT3, conducând la reducerea supraviețuirii și creșterii celulelor canceroase ovariene SKOV3 (Vasilescu et al., 2025).

Împreună, aceste rezultate reprezintă dovezi solide ale faptului că anti-STAT3 mcDNA nu numai că împiedică activarea și funcția STAT3, dar diminuează expresia efectorilor cheie din aval implicați în supraviețuirea și proliferarea celulelor tumorale, ceea ce susține și mai mult potențialul terapeutic al acestui compus sintetic drept inhibitor specific al căii de semnalizare JAK/STAT3 în celulele cancerului ovarian.



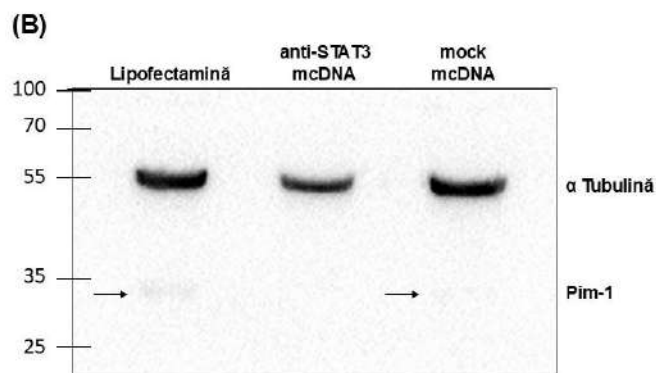


Figura 10: Analiza lizatelor celulare de SKOV3, utilizând metoda Western blot. **(A)** Nivelurile de expresie ale Mcl-1 și GAPDH în celulele SKOV3 tratate numai cu Lipofectamină 3000 (concentrație echivalentă de ADN), anti-STAT3 mcDNA și mock mcDNA la o concentrație de 10 nM. Scara utilizată pentru vizualizarea și validarea acestor proteine este indicată schematic în partea stângă (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 până la 250 kDa); **(B)** Nivelurile de expresie proteică ale Pim-1 și α Tubulină în celulele SKOV3 în aceleași condiții de tratament. Săgețile negre indică benzile proteinei Pim-1, care a fost detectată doar ca fiind prezentă sau absentă din cauza cantității scăzute. Proteina a fost vizualizată folosind SuperSignal™. **(C)** Cuantificarea nivelurilor de expresie Mcl-1 normalizate la GAPDH în toate condițiile de tratament. Semnificația statistică a fost evaluată cu one-tailed unpaired *t*-test. ns – nesemnificativ ($p \geq 0,05$); * $p < 0,05$. Barele de eroare indică $\pm$ SEM. Date dintr-un experiment reprezentativ ($n=3$). Această figură este adaptată după (Vasilescu et al., 2025).

Limitările studiului

Acesta este un studiu de tip proof-of-concept și nu cuprinde întreaga evaluare preclinică a compusului propus. O limitare majoră este utilizarea unei singure linii celulare de cancer ovarian (SKOV3), ceea ce restricționează generalizarea rezultatelor în diverse contexte genetice. În plus, studiul nu include validarea *in vivo*, care este esențială pentru evaluarea farmacocineticii, biodistribuției și eficacității terapeutice a compusului într-un context mai relevant din punct de vedere fiziologic. Deși minicercurile anti-STAT3 sunt proiectate structural pentru a fi foarte stabile și rezistente la nucleaze, până în prezent nu a fost testată nicio strategie de administrare *in vivo*. Metoda de purificare din gel utilizată aici, deși suficientă pentru experimentele *in vitro*, nu este scalabilă pentru cantitățile mari necesare studiilor pe animale. Prin urmare, dezvoltarea unei tehnici alternative de purificare este necesară pentru testele preclinice viitoare. În plus, deși minicercurile afectează în mod clar activitatea STAT3 *in vitro*, mecanismul exact de acțiune rămâne de elucidat. Nu este încă clar dacă efectele observate rezultă din legarea competitivă la domeniile de recunoaștere ADN, sechestrarea STAT3 în citoplasmă, inhibarea dimerizării sau întreruperea semnalizării

în amonte. Sunt necesare studii mecanistice viitoare pentru a clarifica aceste posibilități. Aceste aspecte trebuie abordate în modelele animale ulterioare pentru a determina relevanța clinică și siguranța minicercurilor anti-STAT3.

Perspective

Pentru a adresa aceste limitări, în studiile viitoare intenționăm să evaluăm eficacitatea compusului nostru pe mai multe linii celulare de carcinom ovarian cu profiluri genetice variate și să testăm stabilitatea acestuia atunci când este injectat *in vivo*, determinând capacitatea sa în modele xenograft. Pentru a depăși limitările de scalabilitate, hibridizarea ar putea fi efectuată imediat după etapa de ligare, iar produsul final ar putea fi purificat prin HPLC, permițând o producție cu randament mai mare pentru studiile pe animale. În plus, intenționăm să utilizăm o strategie de administrare *in vivo*, cum ar fi utilizarea nanoparticulelor lipidice solide (SLN) (Akanda, Mithu & Douroumis, 2023) pentru a facilita transportul țintit al anti-STAT3 mcDNA. Aceste SLN sunt cărauși ce pot fi funcționalizați cu anticorpi sau affibodies care recunosc biomarkeri specifici cancerului ovarian, îmbunătățind asimilarea celulară și specificitatea. O astfel de abordare de tip „cal troian” ar putea permite minimizarea efectelor nedorite și toleranța imunitară față de compus, sprijinind dezvoltarea unei terapii personalizate, țintite, bazată pe minicercuri ADN.

IV. CONCLUZII

- ❖ Cancerul ovarian este cunoscut în mod obișnuit drept „ucigașul tăcut”, având în vedere că simptomele sale inițiale sunt neclare și pot fi ușor interpretate greșit, ceea ce duce la diagnosticarea și tratarea tardivă. Astfel, terapia personalizată țintită are potențialul de a îmbunătăți supraviețuirea pe termen lung.
- ❖ Am creat designul unui minicerc anti-STAT3 și al unui minicerc control (mock) și am optimizat protocolul pentru producerea acestora.
- ❖ Am obținut și validat cu succes anti-STAT3 mcDNA, împreună cu omologul său mock, utilizând circularizarea și restricția enzimatică, confirmând conformația sa circulară, dublu-catenară, care se așteaptă să confere rezistență la nucleaze și să sporească stabilitatea în comparație cu moleculele ODN lineare.

- ❖ Specificitatea minicercului anti-STAT3 a fost confirmată prin demonstrarea interacțiunii acestuia cu proteina STAT3, în contrast cu mock mcDNA.
- ❖ Testele funcționale au demonstrat că anti-STAT3 mcDNA a redus semnificativ viabilitatea celulelor SKOV3 într-o manieră dependentă de doză, cu un IC₅₀ în intervalul nanomolar scăzut, indicând o potență ridicată a compusului. Este important de menționat că mock mcDNA nu a afectat viabilitatea celulelor, confirmând specificitatea motivelor de tip GAS pentru inhibiția lui STAT3.
- ❖ Anti-STAT3 mcDNA deplasează în mod eficient echilibrul către apoptoză și necroză, reducând în același timp capacitatea proliferativă a celulelor canceroase ovariene.
- ❖ Tratatamentul cu anti-STAT3 mcDNA a dus la o reducere semnificativă a expresiei genelor anti-apoptotice și pro-supraviețuire controlate de STAT3, *MCL1* și *PIM1*, atât la nivel de ARNm, cât și la nivel de proteină.
- ❖ Deși studiul nostru demonstrează eficacitatea anti-STAT3 mcDNA *in vitro*, acesta constituie baza pentru evaluarea ulterioară a stabilității, biodistribuției și potențialului terapeutic *in vivo*.

MULȚUMIRI

În primul rând, aș dori să îmi exprim recunoștința profundă față de coordonatorul meu de doctorat, Prof. Dr. Ștefan-Eugen Szedlacsek, care mi-a oferit oportunitatea de a-mi desfășura activitatea în cadrul Departamentului de Enzimologie al Institutului de Biochimie al Academiei Române. El m-a îndrumat în rezolvarea problemelor științifice, m-a ajutat în conceptualizarea ideilor experimentale și a dat dovadă de răbdare și înțelegere. Aș dori, de asemenea, să le mulțumesc colegilor mei din Departamentul de Enzimologie, deoarece împreună am format o familie: Andrei-Mihai Vasilescu, Andra-Elena Coșoreanu-Șulea, Cătălin-Constantin Bica și Otilia-Cristina Donțu.

Mulțumesc Prof. Dr. Eyal Arbely de la Departamentul de Chimie al Universității Ben-Gurion din Negev, Israel, care ne-a oferit cu generozitate plasmidul pentru proteina STAT3. De asemenea, mulțumesc Departamentului de Glicoproteine Virale al Institutului de Biochimie al Academiei Române pentru furnizarea anticorpului anti- α Tubulină și a Lipofectaminei 3000.

Lista publicațiilor relevante din timpul pregătirii doctorale

1. **Vasilescu, A.-G.**, Vasilescu, A.-M., Sima, L. E., Baran, N. & Szedlacsek, Ș.-E. 2025. Breaking the cancer code: a novel DNA minicircle to disable STAT3 in ovarian cancer cells SKOV3. *Front. Pharmacol.* 16:1673427. DOI: 10.3389/fphar.2025.1673427.
2. Váradi, B., Brezovcsik, K., Garda, Z., Madarasi, E., Szedlacsek, H., Badea, R.-A., Vasilescu, A.-M., **Puiu, A.-G.**, Ionescu, A. E., Sima, L.-E., Munteanu, C. V. A., Călăraș, S., Vágner, A., Szikra, D., Toàn, N. M., Nagy, T., Szűcs, Z., Szedlacsek, S., Nagy, G. & Tírscó, G. 2023. Synthesis and characterization of a novel [⁵²Mn]Mn-labelled affibody based radiotracer for HER2+ targeting. *Inorg. Chem. Front.* 10. 4734– 4745. DOI: 10.1039/D3QI00356F.
3. Vasilescu, A.-M., **Vasilescu, A.-G.**, Sima, L. E., Munteanu, C. V. A., Baran, N. & Szedlacsek, Ș.-E. 2025. A novel cytotoxic anti-B7-H3 affibody with therapeutic potential in acute myeloid leukemia. *Front. Pharmacol.* 16:1684226. DOI: 10.3389/fphar.2025.1684226.

Postere:

1. **Puiu, A.**, Vasilescu, A. & Szedlacsek, S. 2025. Development of a novel small circular DNA decoy inhibitor targeting STAT3 for cancer therapy. *FEBS Open Bio.* 15:P-32-102. DOI: 10.1002/2211-5463.70071. *The 49th FEBS Congress 2025.* Istanbul.
2. Vasilescu, A., **Puiu, A.** & Szedlacsek, S. 2025. A novel cytotoxic fusion protein targeting B7-H3 for acute myeloid leukemia therapy. *FEBS Open Bio.* 15:P-32-103. DOI: 10.1002/2211-5463.70071. *The 49th FEBS Congress 2025.* Istanbul.
3. Váradi B., Z. Garda Z., Madarasi E., Brezovcsik K., Vágner A., Nagy T., Garai I. M., **Puiu A. G.**, Vasilescu A. M., Szűcs Z., Szedlacsek S. E., Nagy G. & Tírfél Gy. 2022. Labeling of anti-HER2-affibodies with ⁵²Mn via pyclen-based bifunctional ligands: from ligand design to in vivo PET / MR experiments, 35th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2022. Barcelona.

BIBLIOGRAFIE

1. Akanda, M., Mithu, M.S.H. & Douroumis, D. 2023. Solid lipid nanoparticles: An effective lipid-based technology for cancer treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 86:104709. DOI: 10.1016/J.JDDST.2023.104709.
2. Angevin, E., Tabernero, J., Elez, E., Cohen, S.J., Bahleda, R., Van Laethem, J.L., Ottensmeier, C., Lopez-Martin, J.A., et al. 2014. A phase I/II, multiple-dose, dose-escalation study of siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 20(8):2192–2204. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2200.
3. Anglesio, M.S., George, J., Kulbe, H., Friedlander, M., Rischin, D., Lemech, C., Power, J., Coward, J., et al. 2011. IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17(8):2538–2548. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3314.
4. Awasthi, N., Liongue, C. & Ward, A.C. 2021. STAT proteins: a kaleidoscope of canonical and non-canonical functions in immunity and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 14(1):198. DOI: 10.1186/S13045-021-01214-Y.
5. Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G.H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H.J., Reza Ahmadian, M., Moll, J.M., et al. 2018. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6sIL-6Rsgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 293(18):6762–6775. DOI: 10.1074/JBC.RA117.001163.
6. Becker, S., Groner, B. & Müller, C.W. 1998. Three-dimensional structure of the Stat3 β homodimer bound to DNA. *Nature*. 394(6689):145–151. DOI: 10.1038/28101.
7. Bild, A.H., Turkson, J. & Jove, R. 2002. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal*. 21(13):3255. DOI: 10.1093/EMBOJ/CDF351.
8. Calò, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N. & Russo, A. 2003. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*. 197(2):157–168. DOI: 10.1002/JCP.10364.

9. Cheung, L.W.T., Leung, P.C.K. & Wong, A.S.T. 2006. Gonadotropin-releasing hormone promotes ovarian cancer cell invasiveness through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. *Cancer research*. 66(22):10902–10910. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2217.
10. Davidson, B., Tropé, C.G. & Reich, R. 2012. Epithelial–Mesenchymal Transition in Ovarian Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2(APR):33. DOI: 10.3389/FONC.2012.00033.
11. Diegelman, A.M. & Kool, E.T. (in press). Chemical and Enzymatic Methods for Preparing Circular Single-Stranded DNAs . *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. 00(1):5.2.1-5.2.27. DOI: 10.1002/0471142700.NC0502S00.
12. Goumas, F.A., Holmer, R., Egberts, J.H., Gontarewicz, A., Heneweer, C., Geisen, U., Hauser, C., Mende, M.M., et al. 2015. Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. *International journal of cancer*. 137(5):1035–1046. DOI: 10.1002/IJC.29445.
13. Gu, J., Li, G., Sun, T., Su, Y., Zhang, X., Shen, J., Tian, Z. & Zhang, J. 2008. Blockage of the STAT3 signaling pathway with a decoy oligonucleotide suppresses growth of human malignant glioma cells. *Journal of neuro-oncology*. 89(1):9–17. DOI: 10.1007/S11060-008-9590-9.
14. Hendry, L. & John, S. 2004. Regulation of STAT signalling by proteolytic processing. *European Journal of Biochemistry*. 271(23–24):4613–4620. DOI: 10.1111/J.1432-1033.2004.04424.X.
15. Horvath, C.M., Wen, Z. & Darnell, J.E. 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes & development*. 9(8):984–994. DOI: 10.1101/GAD.9.8.984.
16. Hu, X., li, J., Fu, M., Zhao, X. & Wang, W. 2021. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 6(1):1–33. DOI: 10.1038/S41392-021-00791-1.
17. Huang, M., Page, C., Reynolds, R.K. & Lin, J. 2000. Constitutive activation of Stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*. 79(1):67–73. DOI: 10.1006/gyno.2000.5931.
18. Ivashkiv, L.B. & Donlin, L.T. 2014. Regulation of type i interferon responses. *Nature Reviews Immunology*. 14(1):36–49. DOI: 10.1038/NRI3581.

19. Ivashkiv, L.B. & Hu, X. 2004. Signaling by STATs. *Arthritis Research & Therapy*. 6(4):159. DOI: 10.1186/AR1197.
20. Jia, Z.H., Jia, Y., Guo, F.J., Chen, J., Zhang, X.W. & Cui, M.H. 2017. Phosphorylation of STAT3 at Tyr705 regulates MMP-9 production in epithelial ovarian cancer. *PloS one*. 12(8). DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0183622.
21. Jiang, M., Zhang, W., Zhang, R., Liu, P., Ye, Y., Yu, W., Guo, X. & Yu, J. 2020. Cancer exosome-derived miR-9 and miR-181a promote the development of early-stage MDSCs via interfering with SOCS3 and PIAS3 respectively in breast cancer. *Oncogene*. 39(24):4681–4694. DOI: 10.1038/S41388-020-1322-4.
22. Kanda, N., Seno, H., Konda, Y., Marusawa, H., Kanai, M., Nakajima, T., Kawashima, T., Nanakin, A., et al. 2004. STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene*. 23(28):4921–4929. DOI: 10.1038/SJ.ONC.1207606.
23. Liang, D., Wang, Q., Zhang, W., Tang, H., Song, C., Yan, Z., Liang, Y. & Wang, H. 2024. JAK/STAT in leukemia: a clinical update. *Molecular Cancer*. 23(1):1–12. DOI: 10.1186/S12943-023-01929-1/TABLES/4.
24. Lim, C.P. & Cao, X. 2006. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular bioSystems*. 2(11):536–550. DOI: 10.1039/B606246F.
25. Liu, K.D., Gaffen, S.L. & Goldsmith, M.A. 1998. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Current Opinion in Immunology*. 10(3):271–278. DOI: 10.1016/S0952-7915(98)80165-9.
26. Michels, S., Trautmann, M., Sievers, E., Kindler, D., Huss, S., Renner, M., Friedrichs, N., Kirfel, J., et al. 2013. SRC signaling is crucial in the growth of synovial sarcoma cells. *Cancer research*. 73(8):2518–2528. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3023.
27. Murray, P.J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 178(5):2623–2629. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.178.5.2623.
28. Nagaraj, N.S., Washington, M.K. & Merchant, N.B. 2011. Combined blockade of Src kinase and epidermal growth factor receptor with gemcitabine overcomes STAT3-mediated resistance of inhibition of pancreatic tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17(3):483–493. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1670.

29. Neuwirt, H., Puhr, M., Santer, F.R., Susani, M., Doppler, W., Marcias, G., Rauch, V., Brugger, M., et al. 2009. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-1 Is Expressed in Human Prostate Cancer and Exerts Growth-Inhibitory Function through Down-Regulation of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases. *The American Journal of Pathology*. 174(5):1921–1930. DOI: 10.2353/AJPATH.2009.080751.
30. Qian, J., Xue, X. & Shannon, J. (in press). Characteristics of adverse event reporting of Xeljanz/Xeljanz XR, Olumiant, and Rinvoq to the US Food and Drug Administration. *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy*. 28(9):10.18553/jmcp.2022.28.9.1046. DOI: 10.18553/JMCP.2022.28.9.1046.
31. Ren, Y., Xu, R., Wang, Y., Su, L. & Su, J. 2025. Global, regional, and national burden of ovarian cancer in women aged 45 + from 1990 to 2021 and projections for 2050: a systematic analysis based on the 2021 global burden of disease study. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 151(8):225. DOI: 10.1007/S00432-025-06277-9.
32. Roth, C.M. 2005. Molecular and cellular barriers limiting the effectiveness of antisense oligonucleotides. *Biophysical Journal*. 89(4):2286–2295. DOI: 10.1529/biophysj.104.054080.
33. Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U. & Berg, T. 2006. Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chemistry and Biology*. 13(11):1235–1242. DOI: 10.1016/j.chembiol.2006.09.018.
34. Sen, M., Tosca, P.J., Zwyer, C., Ryan, M.J., Johnson, J.D., Knostman, K.A.B., Giclas, P.C., Peggins, J.O., et al. 2009. Lack of toxicity of a STAT3 decoy oligonucleotide. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 63(6):983–995. DOI: 10.1007/S00280-008-0823-6.
35. Sen, M., Thomas, S.M., Kim, S., Yeh, J.I., Ferris, R.L., Johnson, J.T., Duvvuri, U., Lee, J., et al. 2012. First-in-human trial of a STAT3 decoy oligonucleotide in head and neck tumors: implications for cancer therapy. *Cancer discovery*. 2(8):694. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0191.
36. Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J.M.M., Shima, D.T., Hibi, M. & Hirano, T. 1999. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity*. 11(6):709–719. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80145-4.
37. Souissi, I., Najjar, I., Ah-Koon, L., Schischmanoff, P.O., Lesage, D., Le Coquil, S., Roger, C., Dusanter-Fourt, I., et al. 2011. A STAT3-decoy oligonucleotide induces

- cell death in a human colorectal carcinoma cell line by blocking nuclear transfer of STAT3 and STAT3-bound NF- κ B. *BMC cell biology*. 12. DOI: 10.1186/1471-2121-12-14.
38. *STAT3 protein expression summary - The Human Protein Atlas*. n.d. Available: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168610-STAT3> [2025, June 27].
 39. Strehlow, I. & Schindler, C. 1998. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *Journal of Biological Chemistry*. 273(43):28049–28056. DOI: 10.1074/jbc.273.43.28049.
 40. Tamiya, T., Kashiwagi, I., Takahashi, R., Yasukawa, H. & Yoshimura, A. 2011. Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and JAK/STAT Pathways. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 31(5):980–985. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207464.
 41. Tang, X., Sui, X. & Liu, Y. 2023. Immune checkpoint PTPN2 predicts prognosis and immunotherapy response in human cancers. *Heliyon*. 9(1). DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e12873.
 42. Thibault, T., Degrouard, J., Baril, P., Pichon, C., Midoux, P. & Malinge, J.M. 2017. Production of DNA minicircles less than 250 base pairs through a novel concentrated DNA circularization assay enabling minicircle design with NF- κ B inhibition activity. *Nucleic acids research*. 45(5). DOI: 10.1093/NAR/GKW1034.
 43. Timofeeva, O.A., Chasovskikh, S., Lonskaya, I., Tarasova, N.I., Khavrutskii, L., Tarasov, S.G., Zhang, X., Korostyshevskiy, V.R., et al. 2012. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 287(17):14192–14200. DOI: 10.1074/jbc.M111.323899.
 44. Turkson, J., Ryan, D., Kim, J.S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebt, S., et al. 2001. Phosphotyrosyl Peptides Block Stat3-mediated DNA Binding Activity, Gene Regulation, and Cell Transformation. *Journal of Biological Chemistry*. 276(48):45443–45455. DOI: 10.1074/jbc.M107527200.
 45. Vasilescu, A.-G., Vasilescu, A.-M., Sima, L.E., Baran, N. & Szedlacsek, Ștefan-E. 2025. Breaking the cancer code: a novel DNA minicircle to disable STAT3 in ovarian cancer cells SKOV3. *Frontiers in Pharmacology*. 16. DOI: 10.3389/fphar.2025.1673427.
 46. Verstovsek, S., Mesa, R.A., Gotlib, J., Levy, R.S., Gupta, V., DiPersio, J.F., Catalano, J. V., Deininger, M., et al. 2012. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial

- of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*. 366(9):799–807. DOI: 10.1056/NEJMOA1110557.
47. Wu, C.J., Sundararajan, V., Sheu, B.C., Huang, R.Y.J. & Wei, L.H. 2019. Activation of STAT3 and STAT5 Signaling in Epithelial Ovarian Cancer Progression: Mechanism and Therapeutic Opportunity. *Cancers*. 12(1):24. DOI: 10.3390/CANCERS12010024.
 48. Yang, E., Wen, Z., Haspel, R.L., Zhang, J.J. & Darnell, J.E. 1999. The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Molecular and cellular biology*. 19(7):5106–5112. DOI: 10.1128/MCB.19.7.5106.
 49. Yang, E., Lerner, L., Besser, D. & Darnell, J.E. 2003. Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3. *Journal of Biological Chemistry*. 278(18):15794–15799. DOI: 10.1074/jbc.M213073200.
 50. Yang, J., Kunimoto, H., Katayama, B., Zhao, H., Shiromizu, T., Wang, L., Ozawa, T., Tomonaga, T., et al. 2020. Phospho-Ser727 triggers a multistep inactivation of STAT3 by rapid dissociation of pY705–SH2 through C-terminal tail modulation. *International Immunology*. 32(2):73–88. DOI: 10.1093/INTIMM/DXZ061.
 51. Yue, P., Zhang, X., Paladino, D., Sengupta, B., Ahmad, S., Holloway, R.W., Ingersoll, S.B. & Turkson, J. 2012. Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene*. 31(18):2309–2322. DOI: 10.1038/ONC.2011.409.
 52. Zhang, H., Li, H.S. & Watowich, S.S. 2016. Jak-STAT Signaling Pathways. *Encyclopedia of Immunobiology*. 3:134–145. DOI: 10.1016/B978-0-12-374279-7.11015-X.
 53. Zhang, Q.Y., Ding, W., Mo, J.S., Ou-yang, S.M., Lin, Z.Y., Peng, K.R., Liu, G.P., Lu, J.J., et al. 2024. Novel STAT3 oligonucleotide compounds suppress tumor growth and overcome the acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*. 45(8):1701–1714. DOI: 10.1038/S41401-024-01261-4.
 54. Zhang, X., Zhang, J., Wang, L., Wei, H. & Tian, Z. 2007. Therapeutic effects of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide on human lung cancer in xenograft mice. *BMC Cancer*. 7(1):1–11. DOI: 10.1186/1471-2407-7-149/FIGURES/5.