

ROZPRAWA DOKTORSKA

Functional Genomic Profiling of Lung Adenocarcinoma and Bladder Carcinoma

mgr Raneem Yaseen Hamouz
Promotor: prof. dr. hab. n. med. Andrzej K. Bednarek

Zakład Kancerogenezy Molekularnej
Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii
Oddział Nauk Biomedycznych
Wydział Lekarski

A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the Medical University of Lodz
for the degree of Doctor of Philosophy



Łódź 2023

Streszczenie w języku polskim

Formowanie się ogniska nowotworowego oraz progresja choroby są uzależnione od zmian genetycznych i epigenetycznych w komórkach raka, a także reorganizacji otaczającego je mikrośrodowiska (ang. tumor microenvironment, TME). Poza komórkami nowotworowymi, w mikrośrodowisku znajdują się komórki układu immunologicznego oraz niekomórkowe komponenty macierz zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM). Hanahan i Weinberg zaproponowali, że wraz z nietabilnością genomu i postępującym procesem zapalnym, unikanie destrukcji przez układ immunologiczny jest jedną z cech charakterystycznych komórek nowotworowych. Opisali również, że nowotwory wykazują jeszcze inny wymiar złożoności w postaci repertuaru pozornie normalnych komórek nabywających cech inwazyjności poprzez interakcje z TME. Czynniki, które mogą modulować przebieg kancerogenezy są m.in. spożycie alkoholu bądź palenie tytoniu, metabolizm ksenobiotyków, różnice między płciami i ekspozycja na kancerogeny chemiczne. Mogą one zaburzyć przebieg metabolicznych ścieżek sygnałowych oraz wpłynąć na epigenetyczne mechanizmy regulacyjne. Stwierdzono, że interakcje między komórkami nowotworowymi, a TME sprzyjają heterogenności nowotworu, a także ułatwiają formowanie się przerzutów.

Przejście epithelialno-mezenchymalne (ang. epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) jest głównym czynnikiem przyczyniającym się do agresywnego zachowania komórek raka odpowiedzialnych za inwazyjny wzrost i przerzuty. Jednym z czynników aktywujących EMT są interakcje zachodzące między komórkami guza, a komórkami obecnymi w TME. Sygnalizacja z mikrośrodowiska guza jest istotnym modulatorem inwazyjności komórek nowotworowych. Ponadto, komórki te przeprowadzają preferencyjnie glikolizę tlenową; zjawisko określane jako „efekt Warburga” jest cechą charakterystyczną promującą wzrost, przeżycie, proliferację i metastazę nowotworu. Komórki tworzące ognisko raka mogą komunikować się również z komórkami układu immunologicznego i wykorzystywać mechanizmy prozapalne w celu promocji dalszego wzrostu i progresji choroby. Wykazano też, że różne szlaki metaboliczne mogą być regulowane przez cząsteczki miRNA wspomagające kancerogenezę w wyniku alteracji przebiegu takich procesów jak m.in. cykl komórkowy.

Celem tego projektu było profilowanie transkryptomu gruczolaka płuca. Istnieje wiele procesów adaptacyjnych umożliwiających komórkom nowotworowym utrzymanie szybkiego wzrostu i przeżycie poprzez modulowanie złożonych interakcji wewnątrzkomórkowych na różnych poziomach regulacji. Jest to klucz do zrozumienia biologicznych mechanizmów kancerogenezy. W pierwszym przedstawionym artykule zidentyfikowano geny mitotyczne zaangażowane w rozwój raka, które ulegają deregulacji w wyniku ekspozycji na nikotynę. Ponadto zaobserwowano zróżnicowany przebieg przejścia EMT u obecnych palaczy i nigdy nie palących, który ponadto różnił się pomiędzy płciami. Wykazano nadekspresję genów transportera kasety wiążącej ATP (ABC), charakterystyczną w grupach palaczy i mężczyzn. W trzecim artykule opisano różny przebieg kancerogenezy u kobiet i mężczyzn. Stwierdzono, że regulacja układu immunologicznego i homeostaza komórkowa, kluczowe elementy rozbieżnych mechanizmów progresji raka u obu płci, przebiegają w odmienny sposób. Zbadano również ekspresję genów docelowych dla receptorów hormonalnych będących czynnikami transkrypcyjnymi, która wynika ze zróżnicowanego poziomu hormonów płciowych, a nie metabolizmu ksenobiotyków. W kolejnej pracy dokonano przeglądu roli mikroRNA w regulacji przerzutów i angiogenezy BLCA.

Badania przeprowadzone w poniższej rozprawie doktorskiej stanowią funkcjonalną analizę zmienności ekspresji w kontekście przebiegu kancerogenezy. Kompleksowa sieć interakcji wewnątrzkomórkowych w tkance nowotworowej ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia fenotypu obserwowanego u pacjentów oraz wnioskowania o funkcjonalnych powiązaniach między genami. Takie podejście do analizy asocjacji genów umożliwia ujawnienie programu transkrypcyjnego odpowiadającego za charakterystyczny przebieg choroby. Funkcjonalne powiązanie nie tylko ujawnia bezpośrednie interakcje, ale także interakcje regulacyjne, na które wpływa gen o określonych funkcjach biologicznych, umożliwiając wgląd w sieć istotnie zróżnicowanych genów poprzez znane powiązania regulacyjne.

Podsumowując, implikacją przedstawionych badań jest lepsza charakterystyka molekularnych i biologicznych mechanizmów kancerogenezy płuca (LUAD) i pęcherza moczowego (BLCA). Przedstawione analizy ekspresji genów na poziomie komórki jako systemu stanowią porównanie programów transkryptomicznych między guzami płuca u kobiet i mężczyzn, a także u osób palących i nigdy nie palących. Ponadto wykazano, jak palenie tytoniu wpływa na aktywność transkrypcyjną E2F i szlaki naprawy uszkodzeń DNA. Na koniec, w BLCA przedstawiono rolę kilku cząsteczek miRNA i sposób, w jaki są one zaangażowane w regulację procesu metastazy i angiogenezy oraz sposób, w jaki można je uznać za biomarkery diagnostyczne bądź cząsteczki o potencjale terapeutycznym w przyszłych badaniach.

Streszczenie w języku angielskim

Tumour formation and progression include genetic/epigenetic changes in the tumour cells and the resulting rearrangement of the components of the tumour microenvironment (TME). The TME not only consists of tumour cells, but additionally immune cells and non-cellular components of the extracellular matrix (ECM). Hanahan and Weinberg proposed that along with genome instability and inflammation, evading immune destruction is another cancer hallmark. They also described that tumours exhibit yet another dimension of complexity by containing a repertoire of recruited ostensibly normal cells ascribing the acquisition of hallmarks traits by creating the TME. Some factors affecting carcinogenesis include, tobacco/alcohol exposure, metabolism of xenobiotics gender differences and chemical carcinogens. These factors might affect metabolic pathways and can influence the activity of epigenetic regulators resulting in significant global epigenetic changes. The crosstalk between the tumour cells and the TME contributes to the cancer-favourable microenvironment promoting cell heterogeneity and plasticity, as well as enhancing metastasis formation. These changes presenting as biological conditions are the consequences of a number of molecular interactions.

Moreover, epithelial mesenchymal transition (EMT) is a major contributor to the aggressive behaviour of cells responsible for invasive growth and metastasis. EMT plays an important role in tumour progression and metastatic invasion. The most prominent conduit for EMT activation is the heterotypic interactions occurring between carcinoma cells and those residing in the TME. The signals provided by the primary TME are vital modulators of the invasive and metastatic ability of tumour cells. Additionally, tumour cells exhibit aerobic glycolysis; a phenomenon termed “the Warburg Effect” a hallmark of rewired metabolism to promote growth, survival, proliferation, and metastasis. It has been proposed that energy metabolism switch (the Warburg Effect) presents direct signalling functions to cancer cells promoting tumorigenesis as a result of this signal transduction affecting other cellular processes. Moreover, tumour cells are able to communicate with cells in the immune system and support pro-tumour immunity. Finally, impaired microRNA regulation of cell cycle progression aiding in carcinogenesis and have been confirmed to regulate metabolic pathways.

The aim of this project was to investigate transcriptome of the lung adenocarcinoma. There are numerous adaptive processes during which cancer cells undergo to maintain rapid growth and survival by mapping complex intracellular interactions across different levels of regulation. This is key to understanding complex biological mechanisms of cancer. The first paper identified mitotic genes involved in cancer development to be deregulated by direct nicotine exposure. Additionally, a contradictory pattern for epithelial to mesenchymal transition members in current smokers and never smokers due to direct nicotine exposure and gender differences was observed. The expression of ATP binding cassette (ABC) transporter genes seemed to be upregulated separately in our smoker and male groups. In the third paper to uncover sex differences in LUAD carcinogenesis prior pathway enrichment analysis to differentially expressed genes, gene sets were made more homogenous by applying network clustering. The regulation of immune system and cellular homeostasis key elements of divergent cancer progression between the two sexes were found to be different. The expression of circulating hormonal transcriptional targets which seems to be in part attributable to the attributable to the differential presence of the levels of endogenous sex related hormones rather than nicotine/carcinogen exposure was explored. In the second paper the role of microRNAs in the regulation of BLCA metastasis and angiogenesis was reviewed.

Together, the work presented contributes to a more insightful approach by studying gene sets from a functional perspective. A comprehensive network of intracellular interactions in cancer tissue is crucial to unravel the complexity in the phenotype, inferring functional associations between genes. This approach to a gene association analysis will help detect the accumulative effect of a group of functionally related genes aiding in revealing the transcriptional program accounting for the variability in the phenotype. Functional association not only unveils direct interactions, but also regulatory interactions affected by a of genes with specific biological functions giving insights into DEG network through filtering and directed regulatory links.

To conclude, the work provided a better characterisation of the molecular and biological mechanisms of LUAD and BLCA tumour development. It presented analyses of gene expression at a system level, comparing transcriptome organisation between male and female LUAD samples, as well as smokers and never smokers. Furthermore, it showed how smoking clearly affected E2F transcriptional activity and DNA repair pathways. Finally, in BLCA the roles of a few microRNAs (miRNAs) and how they are involved in the regulation of metastasis and angiogenesis and how they could be considered as therapeutic modalities or as diagnostic biomarkers in future research was presented.