

**Mohammed Imran Khan**

## **„Analysis of Gene Expression Pattern in Renal Cell Carcinoma Stem Cells Derived from Primary and Metastatic Cancer Site”**

### **Introduction**

Human renal cell carcinoma (RCC), which is the most common type of kidney cancer arise from a variety of specialized cells located along the length of nephron. RCC has the highest rate of mortality among the genitourinary cancers such as bladder cancer, prostate cancer, and testicular cancer etc. RCC accounts for 3% of all cancer cases worldwide and incidence of RCC has been steadily rising over the last 30 years [1]. The biology of RCC is heterogeneous which comprises several histological types and each subtype show high variability in clinical course. The prognosis of RCC is poor and more than 60% of primary RCC patients have higher mortality because of late detection which eventually leads to metastatic RCC [2, 3]. It is hypothesized that drug resistance, disease progression, metastasis and recurrence of RCC are mediated by stem cell-like cancer cells (SCLCCs) [4-6]. These SCLCCs are like normal stem cells, shares some common characteristic like self-renew give rise to differentiated non-clonogenic progeny and are capable of drug resistance, colony forming, present of specific cancer associated markers, reconstituting the whole tumor upon transplantation. Mechanism and origin of malignant transformation of the normal stem cell to SCLCCs still need to be discovered. Therefore, concerning to the development of efficient treatment strategies and therapeutic target for RCC prevention, isolation and characterization of SCLCCs from RCC is important. It is also crucial to identify biomarkers and develop novel targeted therapies using SCLCCs gene expression profiling. In recent years several techniques for detection and enumeration of SCLCCs have been developed in RCC. We used the membrane marker based approach to isolate SCLCCs by using flow cytometry. The main goal of this research was to describe the gene-expression pattern of SCLCCs isolated from primary tumor and metastatic

### **Work Goals**

We designed this *in vitro* research model to check the expression level of altered gene from SCLCCs using microarray, bioinformatics and molecular biology tools to carry out this research. In this study, we selected CD105 and CD133 markers to further investigate the potential presence of SCLCCs in RCC cell lines.

**The main objective of this research are:**

**Objective 1:** To develop an *in vitro* culture model for stem cell-like cancer cells (SCLCCs).

**Objective 2:** To characterise the SCLCCs isolated from primary and metastatic RCC.

**Objective 3:** To compare the gene expression data of SCLCCs isolated from primary and metastatic RCC.

**Objective 4:** Analysis of altered pathways observed in SCLCCs by using gene expression data.

## **Materials and methods**

We performed real-time PCR analysis of stem related genes such as Oct-4, Nanog and Ncam. Soft agar colony formation assay were used to observed the stemness characteristics of renal cell carcinoma (RCC) cell lines. Fluorescence-activated cell sorting and analysis of CD105+ and CD133+ cells was performed on RCC cells. Sorted CD105+ cells from primary and metastatic cell lines were verified for expression of mesenchymal markers—CD24, CD146, CD90, CD73, CD44, CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DR and alkaline phosphatase. Hanging drop/sphere formation assay was used to investigate CD105+ cell-cell cohesion. We also analysed the free-floating 3D spheres formed by isolated CD105+, as spheres origination from CD105+ cells have been hypothesized to contain undifferentiated multipotent progenitor cells. Lastly, Sorting of CD105+ cells from primary (Caki-2) and metastatic (ACHN) renal cell cancer cell lines was performed. Microarray based gene-expression profiling of sorted CD105+ cells was performed with Agilent's human GE 4x44K v2 microarrays chip. List of differentially expressed genes from both of sorted cells were further categorized into canonical pathways. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was performed for construction of genes network and downstream analysis associated with differentially expressed genes.

## **Results**

We observed that metastatic RCC cell lines such as ACHN and Caki-1 shows higher colony-forming ability when it was compared to primary RCC cell lines such as 786-O, 769-P, Caki-2, SMKT-R2, SMKT-R3 and RCC-6. Metastatic RCC cells also harbor SCLCCs-CD105+ cell subpopulations and shows higher expression of stemness genes like Oct-4 and Nanog. Under hanging drop and suspension conditions CD105+ cells adopt 3D grape-like floating structures. Sorted CD105+ cells are positive for human mesenchymal stem cell (MSC) markers CD90, CD73,

CD44, CD146, and alkaline phosphatase activity, but not for CD24 and hematopoietic lineage markers CD34, CD11b, CD19, CD45, and HLA-DR. There were 1411 genes were commonly differentially expressed in CD105+ cells (both from primary [Caki-2] and metastatic RCC [ACHN] cells) when compared to a healthy kidney epithelial cell line (ASE-5063). TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -catenine, epithelial-mesenchymal transition (EMT), Rap1 signaling, PI3K-Akt signaling, and Hippo signaling pathway are deregulated in CD105+ cells. TGFB1, ERBB2, and TNF are the most significant transcriptional regulators activated in these cells.

## **Summary**

First, I analysed the RCC subtypes based on the immunocytochemistry (ICC) staining of CD10 and CK7 surface markers. These experiment was necessary for recognition of the RCC cell lines subtypes associated with different histology. The cells positive for CD10 and CK7 staining recognise clear cell RCC (ccRCC) and papillary RCC (pRCC) subtype, respectively. Another ICC experiment was performed to analyse the potential stem cell marker proteins in RCC cells. CD44, CD24, CD34, CD105, and CD133 markers was used for initial screening of different stem cell markers. Following flow cytometric data analysis we chosen CD105 and CD133 as potential stem cell marker for further research. Real-time PCR analysis of stem genes, Oct-4, Nanog and Ncam, and soft agar colony formation assay was performed to check the stemness properties of RCC cell lines in this project. Isolated SCLCCs-CD105+ cells were later analysed for human mesenchymal markers CD24, CD146, CD90, CD73, CD44 and hematopoietic lineage markers CD34, CD11b, CD19, CD45, and HLA-DR. Cell culture characteristics of CD105+ cells were also analysed by adopting culture in hanging drop, colony formation, and alkaline phosphatase assay. These results demonstrated the behaviour of CD105+ cells in specific environment upon standard cell culture.

Gene expression profiling was done using microarray on isolated CD105+ cells from primary and metastatic RCC cells. Microarray data shows that 5087 genes were differently expressed in CD105+ cells from metastatic RCC cell line in which 2324 genes were up-regulated while 2763 genes were down-regulated. In CD105+ cells from primary RCC, 2960 genes were found differentially expressed, 1346 genes were up-regulated and 1614 genes were down-regulated. Gene expression data of both type of isolated CD105+ cells were compared with healthy kidney epithelial cell line. Later we compared the gene expression data from primary CD105+ cells vs metastatic CD105+ cells. There were 1411 genes which were commonly differentially expressed

gene in both type of cells those were exported for further bioinformatics analysis. We performed gene ontology (GO) analysis for the significantly enriched gene ontology (GO) terms based on molecular function. The most important GO terms associated with metastatic CD105+ and primary CD105+ cells were mentioned in this study. Ingenuity pathway analysis (IPA) and KEGG analysis were performed with common differentially expressed genes of CD105+ cells to get insight into altered pathways, genes network, significant transcriptional regulators and diseases associated with RCC. TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -catenine, epithelial-mesenchymal transition (EMT), Rap1 signaling, PI3K-Akt signalling, and Hippo signaling pathway were found deregulated in CD105+ cells. The most significant transcriptional regulators activated in these cells were TGFB1, ERBB2, and TNF. Combining all these results together shows RCC-CD105+ cells present stem cell-like cancer cell properties. These stem cell-like cancer cells may represent a novel target for therapy. A unique gene-expression profile of CD105+ cells could be used as initial data for subsequent functional studies and drug design.

1. Costa LJ, Drabkin HA: **Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies.** *The oncologist* 2007, **12**(12):1404-1415.
2. Eggener S: **TNM Staging for Renal Cell Carcinoma: Time for a New Method.** *European urology* 2010, **58**(4):517-519.
3. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI, Picken MM: **Metastatic renal cell carcinoma.** *Current treatment options in oncology* 2003, **4**(5):385-390.
4. Khan MI, Czarnecka AM, Duchnowska R, Kukwa W, Szczylik C: **Metastasis-Initiating Cells in Renal Cancer.** *Current signal transduction therapy* 2014, **8**(3):240-246.
5. Khan MI, Czarnecka AM, Helbrecht I, Bartnik E, Lian F, Szczylik C: **Current approaches in identification and isolation of human renal cell carcinoma cancer stem cells.** *Stem Cell Res Ther* 2015, **6**(1):178.
6. Khan MI, Czarnecka AM, Lewicki S, Helbrecht I, Brodaczewska K, Koch I, Zdanowski R, Krol M, Szczylik C: **Comparative Gene Expression Profiling of Primary and Metastatic Renal Cell Carcinoma Stem Cell-Like Cancer Cells.** *PloS one* 2016, **11**(11):e0165718.

# **Streszczenie**

## **Wstęp**

Rak nerkowokomórkowy [renal cell carcinoma, RCC], najczęstszy typ nowotworu nerki, może rozwijać się z różnych komórek budujących nefron. Śmiertelność pacjentów z rakiem nerkowokomórkowym jest największa wśród nowotworów układu moczowo-płciowego, takich jak rak pęcherza moczowego, prostaty czy jąder. RCC jest odpowiedzialny za 3% wszystkich przypadków nowotworów odnotowywanych na całym świecie i jego występowanie w trakcie ostatnich 30 lat stale wzrasta [1]. Rak nerkowokomórkowy jest heterogenny, tj. wyróżnia się wiele jego typów histologicznych, a każdy podtyp wykazuje wysoki stopień różnorodności przebiegu klinicznego. Rokowania dla tego nowotworu są niekorzystne, a z powodu późnego wykrywania choroby u 60% pacjentów rozwijają się przerzuty, co skutkuje wysoką śmiertelnością RCC [2,3].

Przypuszcza się, że lekooporność/oporność na terapię, progresja, przerzutowanie i nawrót RCC warunkowane są przez macierzystopodobne komórki nowotworowe [SCLCC, stem cell-like cancer cells] [4-6]. Charakteryzują się podobnymi właściwościami jak prawidłowe komórki macierzyste, takimi jak: zdolność do samoodnawiania własnej populacji i różnicowania czy tworzenia kolonii. Są także często odporne na działanie leków i posiadają specyficzne markery nowotworowe oraz mogą odtwarzać cały guz po przeszczepieniu. Mechanizm przekształcania prawidłowych komórek macierzystych w SCLCC wciąż nie został poznany. Dlatego dla opracowania skutecznych strategii terapeutycznych i prewencji raka nerkowokomórkowego ważne jest wyizolowanie i scharakteryzowanie jego SCLCC. Umożliwi to zidentyfikowanie markerów tej populacji i opracowanie nowych terapii celowanych z wykorzystaniem profilowania ekspresji genów tych komórek.

W ostatnich latach opracowano kilka technik detekcji i określania liczebności komórek macierzystopodobnych raka nerkowokomórkowego. W niniejszej pracy do izolacji SCLCC zastosowano metodę opartą na obecności markerów powierzchniowych, wykorzystującą cytometrię przepływową. Celem tych badań było określenie wzoru ekspresji genów komórek macierzystopodobnych raka nerki pochodzących z guzów pierwotnych oraz przerzutowych.

## **Cele Pracy**

Opracowano model badawczy *in vitro*, aby określić zmiany ekspresji genów w SCLCC z wykorzystaniem metody mikromacierzy oraz innych narzędzi biologii molekularnej i bioinformatyki.

W niniejszej pracy wybrano markery CD105 i CD133 do identyfikacji komórek macierzystopodobnych w liniach komórkowych RCC.

Głównymi zadaniami pracy są:

**Zadanie 1:** opracowanie komórkowego modelu *in vitro* komórek macierzystopodobnych

**Zadanie 2:** charakterystyka SCLCC wyizolowanych z pierwotnego i przerzutowego raka nerki

**Zadanie 3:** porównanie ekspresji genów SCLCC wyizolowanych z pierwotnego oraz przerzutowego RCC

**Zadanie 4:** analiza zmian w szlakach sygnałowych w SCLCC w oparciu o ekspresję genów

## **Metodyka badań**

Metodą real-time PCR przeprowadzono analizę ekspresji genów związanych z macierzystością komórek, takich jak *Oct-4*, *Nanog* i *Ncam*. Z wykorzystaniem hodowli w półpłynnym agarze (soft agar colony formation assay) oceniono cechy macierzystości linii komórkowych raka nerki. Obecność markerów CD105 i CD133 na komórkach RCC potwierdzono metodą cytometrii przepływową, którą wykorzystano także do sortowania subpopulacji komórek. Następnie komórki CD105+ z linii komórkowych raka pierwotnego i przerzutowego charakteryzowano pod kątem ekspresji markerów mezenchymalnych: CD24, CD146, CD90, CD73, CD44 i fosfatazy alkalicznej. Do oceny interakcji międzykomórkowych komórek CD105+ zastosowano hodowlę w wiszącej kropli. Zdolność do tworzenia zawieszinowych struktur trójwymiarowych przez komórki CD105+ posłużyła do potwierdzenia obecności nieodróżnicowanych multipotencjalnych komórek progenitorowych w tej populacji. Wyszortowane komórki CD105+ z linii komórkowych pierwotnego (Caki-2) oraz przerzutowego (ACHN) raka nerki wykorzystano do profilowania ekspresji genów metodą mikromacierzy z wykorzystaniem chipów Agilent human GE 4x44K v2. Geny o zmienionym poziomie ekspresji w komórkach CD105+ zostały zanalizowane metodą

Ingenuity Pathway Assay (IPA), co umożliwiło skonstruowanie sieci genów i szlaków sygnałowych kluczowych dla komórek macierzystopodobnych raka nerki.

## **Wyniki**

Zaobserwowano wyższą zdolność komórek linii ACHN i Caki-1 [linie przerzutowego RCC] do tworzenia kolonii w porównaniu do linii komórkowych 786-O, 769-P, Caki-2, SMKT-R2, SMKT-R3 i RCC-6 [linie pierwotnego RCC]. Komórki te charakteryzowały się także wyższym poziomem ekspresji czynników *Oct-4* i *Nanog* oraz stwierdzono w nich obecność subpopulacji SCLCC-CD105+. Komórki CD105+ hodowane w wiszącej kropli lub hodowli zawieszinowej formowały struktury trójwymiarowe oraz były pozytywne dla markerów charakterystycznych dla ludzkich MSC: CD90, CD73, CD44, CD146, i wykryto w nich aktywność fosfatazy alkalicznej. Równocześnie stwierdzono u nich brak ekspresji CD24 i markerów linii hematopoetycznej: CD34, CD11b, CD19, CD45 oraz HLA-DR. Zidentyfikowano 1411 genów o zmienionej w porównaniu do komórek linii kontrolnej – linii ASE-5063 [linia komórek nabłonkowych zdrowej nerki] ekspresji w komórkach CD105+ [zarówno z linii Caki-2, jak i ACHN]. W komórkach CD105+ wykryto zaburzenia w szlakach sygnałowych TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -katenina, EMT [epithelial-mesenchymal transition], Rap1, PI3K-Akt i Hippo. Najbardziej istotnymi czynnikami regulującymi transkrypcję aktywnymi w tych komórkach są TGFB1, ERBB2 i TNF.

## **Podsumowanie**

Metodą barwienia immunocytochemicznego oceniono poziom ekspresji markerów powierzchniowych CD10 i CK7 w wykorzystywanych liniach komórkowych w celu określenia ich podtypów histologicznych, wykorzystywanych w klasyfikacji RCC. Obecność markerów CD10 lub CK7 na komórkach charakteryzuje, odpowiednio, raka jasnokomórkowego [ccRCC] lub brodawkowatego [pRCC] nerki. Następnie, za pomocą cytometrii przepływowej określono czy na badanych komórkach występują receptory uznawane za markery komórek macierzystych, m. in.: CD44, CD24, CD34, CD105 i CD133. Aby określić czy badane linie wykazują właściwości komórek macierzystopodobnych, zmierzono w wykorzystywanych liniach poziom ekspresji *Oct-4*, *Nanog* i *Ncam* metodą real-time PCR oraz zdolność do tworzenia kolonii metodą hodowli w półpłynnym agarze. W wyizolowanych SCLCC-CD105+ oceniono obecność markerów komórek mezenchymalnych: CD24, CD146, CD90, CD73, CD44 oraz hematopoetycznych: CD34, CD11b,

CD19, CD45 i HLA-DR. Następnie przeprowadzono funkcjonalną charakterystykę komórek CD105+; zdolność do tworzenia kolonii, interakcje komórkowe w modelu wiszącej kropli oraz aktywność alkalicznej fosfatazy. Przeprowadzone analizy pozwoliły określić zachowanie komórek CD105+ w standardowych warunkach hodowli komórkowej.

Następnie wykonano analizę globalnej ekspresji genów metodą mikromacierzy w komórkach CD105+ - wyizolowanych z linii komórkowej pierwotnego i przerzutowego RCC oraz komórek zdrowej nerki. Wykazano, że w komórkach CD105+ pochodzących z przerzutowego RCC 5087 genów wykazywało zmienioną ekspresję względem komórek nerki. Dla 2324 genów była ona zwiększona, dla 2763 natomiast obniżona. Z kolei w komórkach CD105+ pochodzących z pierwotnego RCC odnotowano zmienioną, względem komórek zdrowych, ekspresję 2960 genów - dla 1346 była ona zwiększona, dla 1614 zmniejszona.

Kolejnym krokiem było porównanie ekspresji genów komórek CD105+ pochodzących z pierwotnego RCC oraz przerzutowego RCC. 1411 genów o zmiennej ekspresji charakteryzujących komórki guza przerzutowego/pierwotnego poddano dokładniejszej analizie bioinformatycznej. Przeprowadzono analizę bazy Gene Ontology (GO) w celu określenia jakie funkcje pełnią zidentyfikowane geny. Programem Ingenuity Pathway Analysis (IPA) oraz w bazie KEGG przeprowadzono analizę genów zmiennie ekspresjonowanych w komórkach CD105+ określając zmienione ścieżki sygnałowe, sieci genów i kluczowe czynniki regulujące transkrypcję związane z RCC oraz innymi chorobami. Analiza wykazała zaburzenie w komórkach CD105+ szlaków sygnałowych TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -katenina, EMT, Rap1, PI3K-Akt oraz Hippo. Najbardziej istotnymi czynnikami regulującymi transkrypcję aktywnymi w tych komórkach są TGFB1, ERBB2 oraz TNF.

Podsumowując, otrzymane wyniki sugerują, że komórki CD105+ raka nerkowokomórkowego wykazują właściwości macierzystopodobnych komórek nowotworowych. Mogą one tym samym stanowić nowy cel dla terapii RCC. Unikalny profil ekspresji genów w komórkach CD105+ może zostać wykorzystany jako wstępne dane dla dalszych badań/analiz funkcjonalnych i projektowania leków.