

mgr farm. Lias Saed

Ocena znaczenia prognostycznego ekspresji genu *HMGA1*
w raku płuca

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Promotor: dr hab. n farm. Aleksandra Sałagacka-Kubiak



Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej,
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2023

Lias Saed, MSc

Evaluation of the prognostic significance of *HMGA1* gene expression
in lung cancer

PhD Thesis

Supervisor: Aleksandra Sałagacka-Kubiak, Assistant Professor, PhD



Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics,
Chair of Laboratory and Molecular Diagnostics,
Medical University of Lodz

Lodz, 2023

Niniejszą pracę dedykuję

Swojej rodzinie obecnej obok oraz w dalszej części świata

W szczególności Tacie Touni Saed, mamie Beacie Saed oraz wujkowi Lias Alsaad, którzy byli dla mnie wsparciem oraz motywacją podczas całej mojej ścieżki naukowej.

Bez was nie byłbym w tym miejscu.

Mojej siostrze Rimal Saed i bratu Musa Saed, którzy są jak moje dwa oczka w głowie.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Promotorowi – dr hab. n. farm. Aleksandrze Sałagackiej-Kubiak

za poświęcony czas oraz opiekę naukową, za dodawanie otuchy w trudnych chwilach, cenne uwagi merytoryczne, nieocenioną pomoc oraz wyrozumiałość, za cierpliwość i zaufanie.

Dziękuję także za pomoc w opublikowaniu oraz przedstawieniu na konferencjach naukowych wyników mojej pracy.

Dziękuję także za wsparcie i ogromną możliwość rozwoju oraz pomoc w wykonaniu niniejszej pracy

Dziękuję również Pani Profesor dr hab. n. farm. Ewie Balcerczak

Za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość, za cenne uwagi naukowe i organizacyjne oraz za każdą chwilę poświęconą w tym celu, a także za czuwanie nad przebiegiem niniejszej pracy.

Dziękuję również za umożliwienie wykonywania moich badań naukowych oraz niezbędnych pomocy w celu opublikowania uzyskanych wyników.

Chciałbym podziękować Panu Profesorowi dr hab. n. farm. Markowi Mirowskiemu

za to, że był dla mnie inspiracją oraz pierwszą osobą, która dodała mi odwagi do podjęcia studiów doktoranckich, dziękuję również za wsparcie, wyrozumiałość i pomoc, na którą zawsze mogłem liczyć.

Składam również serdeczne podziękowania koleżankom i kolegom z całego zakładu, każdemu z osobna za każdą udzieloną pomoc, za każdą chwilę poświęconą, za rodzinną oraz sympatyczną atmosferę, dzięki której mogłem poczuć się pewnie oraz swobodnie wykonując swoją pracę w zakładzie. Dziękuję za cierpliwość i wyrozumiałość oraz za pomoc, na którą zawsze mogłem liczyć.

Jestem wdzięczny oraz dumny, że mogłem poczuć się częścią tego silnie związanego ze sobą oraz wspierającego się w każdych warunkach zespołu.

Słowa kluczowe:

HMGA1, białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej, ekspresja genu, rak płuca, prognozowanie

Key words:

HMGA1, high-mobility group protein, gene expression, lung cancer, prognosis

Niniejsza praca została zrealizowana z wykorzystaniem środków statutowych
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
(503/3-015-02/503-31-001-19-00).

Lista stosowanych skrótów:

AKT (ang. *serine/treonine kinase*) – kinaza serynowo-treoninowa

ALK (ang. *anaplastic lymphoma kinase*) – kinaza chłoniaka anaplastycznego

DRP (ang. *small cell lung cancer, SCLC*) – drobnokomórkowy rak płuca

EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu

EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – gen kodujący receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu

FOXM1/HMGA1/G6PD (ang. *forkhead box protein M1-high mobility group AT-hook 1-G6PD*) – ścieżka regulacji transkrypcji

HMG (ang. *high mobility group proteins*) – białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej

HMGA1 – białko z rodziny A białek HMG

IL-24 – interleukina 24

KRAS (ang. *Kirsten rat sarkoma 2 viral oncogene homolog*) – protoonkogen

miRNA – mikroRNA

MYC (ang. *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) – protoonkogen

NDRP (ang. *non-small cell lung cancer, NSCLC*) – niedrobnokomórkowy rak płuca

PD-L1 (ang. *programmed death-ligand 1*) – ligand programowanej śmierci komórki 1

PGF (ang. *placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu

PI3K/AKT (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase-serine/treonine kinase*) – ścieżka sygnalizacji komórkowej

RB1 (ang. *retinoblastoma-associated protein*) – gen supresorowy

ROS1 (ang. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) – protoonkogenna kinaza tyrozynowa

siRNA (ang. *small interfering RNA*) – małe interferujące RNA

TGFβ (ang. *transforming growth factor β*) – transformujący czynnik wzrostu beta

TNM (ang. *tumour-nodes-metastasis system*) – system oceny stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu

TP53 (ang. *tumour protein 53*) – gen supresorowy

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

WNT/b-katenina (ang. *proto-oncogene Int-1 homolog- β -catenin*) – szlak sygnalizacji komórkowej

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ POSTĘPOWANIA W SPRAWIE O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA	8
2. SYLWETKA NAUKOWA I OPIS DOROBKU NAUKOWEGO DOKTORANTA ..	9
3. WSTĘP	12
3.1 Rak płuca	12
3.2 Gen <i>HMGA1</i> i białko HMGA1 w procesie powstawania i prognozowaniu przebiegu nowotworów	13
3.3 Gen <i>HMGA1</i> i białko HMGA1 w raku płuca	15
4. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	17
5. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH W PRACACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU	19
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	23
7. PIŚMIENNICTWO	25
8. STRESZCZENIE.....	29
9. ABSTRACT.....	31
10. KOPIE ARTYKUŁÓW STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI	33
11. OŚWIADCZENIA	108

1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ POSTĘPOWANIA W SPRAWIE O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA

Podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne stanowi cykl publikacji z lat 2021–2022 o łącznym współczynniku oddziaływania **IF: 9,188** i punktacji **MEiN: 320**.

1. **Lias Saed**, Ewa Olechnowicz, Ewa Balcerczak, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Znaczenie białek HMGA1, HMGA2 i HMGB1 oraz ich genów w raku płuca. *UMedical Reports* 2021, 3, Łódź, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ISBN 978-83-961774-4-5, **MEiN: 80**
2. **Lias Saed**, Agnieszka Jeleń, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Prognostic Significance of *HMGA1* Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, (13):6933. doi: 10.3390/ijms23136933. PMID: 35805937, PMCID: PMC9266824. **IF: 6,208, MEiN: 140**
3. **Lias Saed**, Ewa Balcerczak, Mariusz Łochowski, Ewa Olechnowicz, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. *HMGA1* gene expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: preliminary report. *Molecular Genetics and Genomics* 2022, doi: 10.1007/s00438-022-01936-9. PMID: 35948739. **IF: 2,980, MEiN: 100**

2. SYLWETKA NAUKOWA I OPIS DOROBKU NAUKOWEGO DOKTORANTA

Ukończyłem studia magisterskie na kierunku Farmacja na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W roku 2016 obroniłem pracę magisterską pt.: „Elektroforetyczne metody wykrywania proteinaz obecnych w surowicach i lizatach komórek nowotworowych z użyciem technik zymograficznych i biotynylowanego jodoacetamidu”, zrealizowaną w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Marka Mirowskiego. Wynik uzyskane w pracy magisterskiej zostały opublikowane w *Folia Medica Lodziensia* w 2016 r.

Po ukończeniu jednolitych studiów magisterskich, w roku 2016, podjąłem pracę w aptece ogólnodostępnej, gdzie obecnie zajmuje stanowisko zastępcy kierownika. W roku 2019 rozpocząłem także pracę na stanowisku kierownika hurtowni farmaceutycznej. Prace te kontynuuję nieprzerwanie do dziś. Ukończyłem kursy m.in. monitorowania badań klinicznych (poziom zaawansowany) oraz szkolenia z ramach projektu „FARM@BIO – zintegrowany system rozwoju kompetencji studentów Wydziału Farmaceutycznego oraz Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w odpowiedzi na potrzeby społeczeństwa, rynku pracy oraz gospodarki opartej na wiedzy”.

W październiku 2018 r. rozpocząłem stacjonarne studia doktoranckie w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej w Łodzi. Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy oceny wartości prognostycznej genu *HMGAI* w raku płuca. Pierwszy etap pracy polegał na poznaniu technik stosowanych w ocenie poziomu ekspresji genów oraz przygotowaniu teoretycznym do wybranej tematyki badań, czego efektem jest opublikowana monografia wieloautorska dotycząca znaczenia białek HMGA1, HMGA2 i HMGB1 oraz ich genów w raku płuca. W kolejnych etapach badań doskonalilem metody analiz oraz rozwijałem swój warsztat metodologiczny. Wykorzystując publicznie dostępne dane zgromadzone w repozytoriach genomycznych przeprowadziłem analizy poziomu ekspresji genu *HMGAI* w raku płuca oraz jego znaczenia prognostycznego w tym nowotworze.

Posługując się technikami biologii molekularnej przeprowadził badania ekspresji genu *HMGAI* w tkankach pozyskanych od pacjentów z niedorobnokomórkowym rakiem płuca i następującą oceną jej wartość prognostycznej w tym nowotworze. Wyniki tych badań zostały opublikowane w roku 2022 w postaci dwóch pełnotekstowych artykułów naukowych.

W ramach przewidzianego dla doktorantów pensum dydaktycznego prowadziłem ćwiczenia laboratoryjne z biochemii na kierunkach farmacja i kosmetologia oraz seminaria dotyczące terapii monitorowanej na kierunku analityka medyczna. Obecnie pełnię funkcję nauczyciela przedmiotu farmakologia w ramach kursów dla opiekunów medycznych prowadzonych przez Centrum Edukacji i Rozwoju Osobistego CEIRO. Jestem także autorem publikacji w czasopiśmie popularyzującym zdrowy styl życia MODA NA ZDROWIE pt.: "Koronawirus – wszystko co powinieneś o nim wiedzieć".

Jestem współautorem pięciu pełnotekstowych publikacji naukowych (łącznie IF 11,93 łączna punktacja MEiN 390) oraz trzech komunikatów przedstawianych na konferencjach w formie posterów. Sumaryczny Impact Factor na rok wydania publikacji w prezentowanym cyklu wynosi: 9,19, a sumaryczna liczba punktów MEiN: 320.

Publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Paulina Młudzik, Jacek Pietrzak, Lias Saed, Damian Wodziński, Ida Franiak-Pietryga, Marek Mirowski. Elektroforetyczna identyfikacja proteinaz cysteinowych w surowicach pacjentów z przewlekłą białaczką limfocytową (PBL) z wykorzystaniem biotynylowanego jodoacetamidu. *Folia Medica Lodziensia*, 2016, 43/1:35–52
2. Michalska K, Balcerczak E, Jeleń A, Saed L, Pietrzak J, Żebrowska-Nawrocka M. Effects of the *SLCO1B1* A388G single nucleotide polymorphism on the development, clinical parameters, treatment, and survival of multiple myeloma cases in a Polish population. *Mol Biol Rep*. 2022 Dec 7. doi: 10.1007/s11033-022-08162-x. PMID: 36478296.

Komunikaty zjazdowe:

1. Magdalena Flaszka, Lias Saed, Jacek Pietrzak. Gel zymography, western-blot and real-time PCR methods used in analysis of metalloproteinases in biological materials like cells lysates WM-115, serum and blood from melanoma diagnosed patients. European Pharmaceutical Students Association, "Bringing Pharmacy Knowledge and Students Together", kwiecień 2017.
2. Lias Saed, Ewa Olechnowicz, Ewa Balcerczak, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. *HMGAI* expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer patients – preliminary results. XXIV Gliwice Scientific Meetings/XXIV Gliwickie Spotkania Naukowe. Gliwice, 20-21 listopada 2020.
3. Lias Saed, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Ekspresja genu *HMGAI* w raku płuca - analiza bioinformatyczna danych zgromadzonych w publicznych bazach. IV Śląskie Farmaceutyczne Spotkanie Naukowe „Od nauki do pacjenta”. Sosnowiec, 3 grudnia 2021.

3. WSTĘP

3.1 Rak płuca

Rak płuca jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów złośliwych oraz stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wywołanych nowotworami złośliwymi w skali całego świata [1]. Według danych zgromadzonych przez Krajowy Rejestr Nowotworów rak płuca i tchawicy jest też drugim co do częstości zachorowań nowotworem złośliwym zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn w Polsce [2]. Do roku 2040 prognozowany jest wzrost zachorowalności na raka płuca na świecie o około dwie trzecie wartości obecnych wskaźników [3].

Najważniejszym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka płuca jest aktywne palenie tytoniu, inne to promieniowanie jonizujące, ekspozycja na azbest, rakotwórcze substancje chemiczne i niektóre metale ciężkie (kadm, ołów, nikiel, arsen) [4,5]. Jego rozwojowi mogą sprzyjać również czynniki hormonalne i genetyczne [6].

Do najistotniejszych czynników molekularnych biorących udział w procesie kancerogenezy w płucach należą geny regulujące takie procesy jak kontrola cyklu komórkowego, różnicowanie komórek, naprawa DNA, czy metabolizm ksenobiotyków. Ugruntowana jest tu rola genów *KRAS* (ang. *Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*), *MYC* (ang. *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*), *TP53* (ang. *tumour protein 53*) czy *RBI* (ang. *retinoblastoma-associated protein*). Niepodważalny jest tu także udział genów dla białek z rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*) czy też nadekspresja receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*), którego stała stymulacja daje sygnał do podziału komórki i w rezultacie zwiększania masy nowotworu. W kolejnych etapach kancerogenezy następuje stymulacja powstawania nowych naczyń krwionośnych, gdzie stymulującą rolę odgrywają czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) i łożyskowy czynnik wzrostu (PGF, ang. *placental growth factor*) [6].

Pierwotne nowotwory płuca dzieli się na cztery główne typy histologiczne: rak gruczołowy (45%), rak płaskonabłonkowy (30%), rak drobnokomórkowy (15%), rak wielkokomórkowy (10%). Inne typy stanowią mniej niż 1% wszystkich rozpoznań. W praktyce klinicznej stosuje się podział na drobnokomórkowy (DRP) i niedrobnokomórkowe raki płuca (NDRP) [4]. Rokowanie dla chorych na raka płuca zależy głównie od stopnia zaawansowania klinicznego ocenianego w systemie TNM (ang. *tumour-nodes-metastasis system*) oraz - w przypadku raka gruczołowego - typu i podtypu histologicznego. Rokowanie w DRP jest ogólnie gorsze niż w NDRP [7].

W przypadku NDRP u chorych potencjalnie operacyjnych (stopnie zaawansowania I–II oraz III) opcje terapeutyczne obejmują chirurgiczną resekcję guza, uzupełniająca radioterapię i uzupełniająca chemioterapię. W przypadkach większego zaawansowania, u chorych nieoperacyjnych, stosowane są radioterapia i radiochemioterapia. U chorych z uogólnionym NDRP z aktywującymi zaburzeniami genetycznymi [mutacje genu *EGFR* (ang. *epidermal growth factor receptor*), rearanżacje genów *ALK* (ang. *anaplastic lymphoma kinase*) i *ROS1* (ang. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)] postępowaniem z wyboru jest terapia ukierunkowana molekularnie: inhibitory kinaz tyozynowych EGFR (erlotynib, gefitynib, afatynib, mertynib), ALK i ROS1 (kryzotynib). W przypadkach, gdzie potwierdzono ekspresję PD-L1 (ang. *programmed death-ligand 1*) za pomocą techniki immunohistochemicznej, możliwa jest immunoterapia w wykorzystanie inhibitorów PD-1 (niwolumab, pembrolizumab).

Podstawowym sposobem leczenia DRP jest chemioterapia oparta o związki platyny. U chorych w stopniach I-III wg TNM celowe jest stosowanie radiochemioterapii [4,7].

3.2 Gen *HMGAI* i białko HMGAI w procesie powstawania i prognozowaniu przebiegu nowotworów

Białko HMGAI (wcześniej HMG-I/HMG-Y), kodowane przez gen *HMGAI*, należy do grupy białek o tzw. wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (ang.

high mobility group proteins, HMG), małych niehistonowych białek zwanych „czynnikami architektonicznymi”, ponieważ powoduje prostowanie, zginanie, rozwijanie DNA oraz moduluje strukturę nukleosomów i chromatyny. Przez to reguluje replikację, rekombinację i naprawę DNA, jak również aktywność transkrypcyjną genów kodujących białka zaangażowane w takie procesy jak np. różnicowanie i podziały komórkowe, migracja czy apoptoza. Częsteczki członków rodziny A białek HMG, do której należy HMGA1, wyróżniają się występowaniem trzech domen zwanych hakami AT (ang. *AT-hook*) o powinowactwie do fragmentów DNA bogatych w adeninę i tyminę w rejonach promotorów genów i miejsc regulujących transkrypcję [8].

Wykazano, że fizjologicznie wysoka ekspresja *HMGA1* jest charakterystyczna dla tkanek embrionalnych, natomiast w dojrzałych zróżnicowanych komórkach jest niewykrywalna lub występuje na niskim poziomie [9]. Nasilenie ekspresji tego genu lub zwiększone ilości białka HMGA1 stwierdzano w tkankach wielu różnych nowotworów złośliwych m.in. raka piersi [10], żołądka [11], jelita grubego [12], macicy [13], glejaków [14], włókniakomięsaków [15] i kostniakomięsaków [16].

HMGA1 ma właściwości onkogenne, ale jak białko prowadzi do transformacji nowotworowej, nie jest w pełni wyjaśnione [17,18]. Dowiedziono, że może ono odgrywać rolę jako element kluczowych do nowotworzenia szlaków sygnałowych, np. TGF β (ang. *transforming growth factor β*), PI3K/AKT (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase-serine/tyreonine kinase*), WNT/ β -katenina (ang. *proto-oncogene Int-1 homolog- β -catenin*) [19-22], modulować ekspresji genów istotnych dla regulacji apoptozy, procesu zapalnego, zjawiska przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego czy naprawy DNA [23]. Nasila także wychwyt glukozy i jej aerobowych przemian komórek nowotworowych [24], jak również ich proliferację i migrację [25-27].

Czynny udział białka HMGA1 w nowotworzeniu skłonił do poszukiwania zastosowania nadekspresji *HMGA1*, jak i zwiększonych ilości białka HMGA1 jako czynnika prognostycznego w różnych nowotworach. Dla wielu nowotworów złośliwych poziom ekspresji genu *HMGA1* i zmienione ilości białka HMGA1 zostały powiązane z wysokim stopniem złośliwości, opornością na chemioterapię, skłonnością do przerzutowania i niską

przeżywalnością pacjentów [17,22]. Poziom białka HMGA1 był ujemnie skorelowany z rokowaniem klinicznym w raku jelita grubego, raku prostaty, piersi, czy tarczycy [28-30].

3.3 Gen *HMGA1* i białko HMGA1 w raku płuca

Nadekspresję genu *HMGA1*, jak i zwiększoną ilość białka HMGA1 w porównaniu z komórkami prawidłowego nabłonka oskrzeli stwierdzano dotychczas w komórkach licznych linii raka płuca [31,32]. W większość badań tkanek pierwotnych nowotworów złośliwych płuca stwierdzano wyższą ekspresję genu *HMGA1* i większą ilość białka HMGA1 niż w prawidłowej tkance płuc [31-35]. Przyczyną nadekspresji *HMGA1* w rakach płuc mogą być czynniki epigenetyczne bądź amplifikacją genu *HMGA1* [36-38]. Wzrost ilości HMGA1 był obserwowany w komórkach oskrzeli o cechach hiperplazji, metaplazji i dysplazji, co sugeruje, że do uaktywnienia genu *HMGA1* dochodzi na wczesnym etapie kancerogenezy [34]. Barh i wsp. [33] zaobserwowali podwyższoną ekspresję *HMGA1* także we krwi chorych z NDRP o typach raka płaskonabłonkowego i gruczolakoraka w porównaniu z poziomem tej ekspresji we krwi osób zdrowych.

Zwiększona ekspresja *HMGA1* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka związana jest z udziałem HMGA1 w regulacji ważnych komórkowych szlaków przekazywania sygnału. W komórkach nabłonka oskrzeli białko to jest jednym z głównych elementów sieci molekularnej, aktywowanej przez nieprawidłową konstytutywną sygnalizację PI3K/AKT [21] i jednym z głównych genów w sieci oddziaływań z miRNA w patogenezie NDRP [33,39-41]. Onkogenne działanie HMGA1 wiąże się m.in. z jego udziałem w procesach adhezji i migracji oraz inwazyjności komórek oraz procesie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego [31,32,42].

Poza opisaną powyżej rolą HMGA1 w procesie powstawania nowotworów płuc, białko to ma również potencjalne znaczenie w odpowiedzi na konwencjonalną chemioterapię, jak i leczenie celowane. Zhang i wsp. [43] udowodnili, że HMGA1, współtworząc ścieżkę regulacyjną

FOXM1/HMGA1/G6PD (ang. *forkhead box protein M1-high mobility group AT-hook 1-G6PD*), może przyczyniać się do oporności na cisplatynę komórek NDRP. Nasilenie fosforylacji HMGA1 związane z sygnalizacją zależną od EGFR skutkuje opornością na gefitinib, a wyciszenie ekspresji *HMGA1* nasila działanie tego leku w komórkach ludzkiego gruczoraka płuc [44].

Ponieważ nasilenie ekspresji *HMGA1* bądź zwiększenie ilości kodowanego przez niego białka jest cechą charakterystyczną nowotworów płuca, poprowadzone były eksperymenty mające na celu ocenę użyteczności hamowania tej ekspresji. Blokowanie ekspresji *HMGA1* za pomocą sekwencji natywnych osłabiało proliferację hodowanych komórek raka płuca [45]. Jednoczesne wyciszenie *HMGA1* za pomocą siRNA i podanie IL-24 dawało w efekcie istotny spadek ekspresji AKT (ang. *serine/threonine kinase*) oraz zdolności do migracji i inwazyjności komórek raka płuca *in vitro* [41].

Prognostyczne znaczenie ekspresji genu *HMGA1* i białka HMGA1 udowodnione dla różnych nowotworów złośliwych, jak i obserwowana nadekspresja *HMGA1* i zwiększona ilość HMGA1 w tkankach raka płuca stały się przyczynkiem do poszukiwania prognostycznego znaczenia ich znaczenia w tym nowotworze. Większość z nich dotyczyła badania białka HMGA1 i jak dotąd nie przyniosły one jednoznacznych wyników. Sarhadi i wsp. [34] wykazali związek między obecnością białka HMGA1 w jądrach komórek gruczolakoraka płuca i krótszym czasem przeżycia chorych. Wysoka ekspresja genu *HMGA1* była związana z krótszym czasem przeżycia chorych z NDRP w badaniu przeprowadzonym przez Ma i wsp. [32]. Wysoka ekspresja białka HMGA1 w tkance NDRP była związana z wielkością guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych oraz z wyższym zaawansowaniem wg klasyfikacji TNM, jak również niskim zróżnicowaniem histologicznym tkanki nowotworowej. W analizie wieloczynnikowej była niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym i łączyła się z krótszym czasem przeżycia chorych [35,43]. Podobnych zależności między ilością HMGA1 a przeżyciem pacjentów z NDRP nie zanotowali natomiast Lin i Peng [46].

4. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Rak płuca, pomimo postępów w zrozumieniu czynników ryzyka jego rozwoju, patogenezy, jak i pojawiania się nowych metod leczenia, pozostaje jednym z najczęstszych, a zarazem najbardziej śmiertelnych nowotworów na świecie. Dominującym podtypem raka płuca, który odpowiada za ok. 85% jego przypadków, jest NDRP. Analizy genomiczne i badanie szlaków sygnałowych ujawniły, że guzy NDRP wykazują dużą heterogenność genetyczną i komórkową, co może determinować przebieg choroby oraz wyniki leczenia chirurgicznego i farmakologicznego. Dlatego nowych, doskonalszych niż obecne czynników prognostycznych i predykcyjnych dla tego nowotworu poszukuje się m.in. w obrębie zmian w sekwencji bądź ekspresji genów. Szczególnie pożądane jest znalezienie markerów, które mogłyby być ocenione w łatwo dostępnym materiale biologicznym, np. krwi obwodowej.

Obiecującym czynnikiem prognostycznym raku płuca może być poziom ekspresji genu *HMGA1*. Gen ten koduje niehistonowe białko HMGA1, którego zadaniem jest regulowanie indukowanej transkrypcji genów. Ekspresja genu *HMGA1*, jak i ilość białka HMGA1 jest często wysoka w komórkach nowotworowych i koreluje z zaawansowaniem choroby lub zdolnością do tworzenia przerzutów. Wartość prognostyczną poziomu ekspresji genu *HMGA1* wykazano w przypadku niektórych nowotworów, m.in. raka trzustki, żołądka, endometrium, czy raka wątrobowokomórkowego. Jednak wiedza na temat jego znaczenia w raku płuca jest wciąż ograniczona.

W niniejszej pracy poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy poziom ekspresji genu *HMGA1* może być czynnikiem prognostycznym w raku płuca, jak również czy oznaczanie poziomu *HMGA1* we krwi obwodowej u chorych z NDRP w czasie diagnozy i okresie pooperacyjnym może być czynnikiem użytecznym w przewidywaniu dalszego przebiegu choroby.

Cele szczegółowe badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej:

- ocena wartości prognostycznej poziomu ekspresji genu *HMGA1* w raku płuca przy wykorzystaniu publicznie dostępnych danych zgromadzonych w bazach genomycznych

- ocena wartości prognostycznej poziomu ekspresji genu *HMGAI* w tkance nowotworowej i krwi pozyskanych od chorych z NDRP.

5. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ BADAWCZYCH W PRACACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

Uzasadnienie połączenia publikacji w cykl:

Publikacje wybrane do cyklu poruszają tematykę znaczenia prognostycznego genu *HMGA1* w raku płuca. Przedstawiany cykl publikacji jest spójny tematycznie, zawiera trzy uzupełniające się prace. Pierwsza publikacja o charakterze poglądowym („Znaczenie białek HMGA1, HMGA2 i HMGB1 oraz ich genów w raku płuca”) poprzedza właściwe badania i stanowi przegląd aktualnego piśmiennictwa na temat wybranych białek i kodujących je genów z rodziny HMG, tj. HMGA1, HMGA2 i HMGB1 – ich charakterystykę oraz rolę w procesie nowotworzenia. Główna jej część obejmuje szczegółowe omówienie wyników dotychczasowych badań dotyczących ekspresji wymienionych genów i białek i ich znaczenia prognostycznego w nowotworach płuc. Stosunkowo niewielka ilość danych na temat ekspresji genu *HMGA1* w nowotworach płuc oraz niejednoznaczne ich wyniki, co omówiono w monografii, uzasadniły wybór dalszych działań naukowych, które stały się podstawą pozostałych dwóch pozostałych prac składających się na cykl.

W drugiej publikacji („Prognostic Significance of *HMGA1* Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis”) przedstawiono wyniki analiz bioinformatycznych publicznie dostępnych danych wielkoskalowych porównujących poziom ekspresji *HMGA1* w tkankach raka płuc do ekspresji tego genu w prawidłowej tkance tego narządu oraz oceniających związek ekspresji *HMGA1* w tkance nowotworowej z cechami kliniczno-patologicznymi oraz czasem przeżycia pacjentów z rakiem płuca. Trzecia publikacja („*HMGA1* gene expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: preliminary report”) stanowi rozwinięcie wcześniejszych badań *in-silco* o ocenę ekspresji genu *HMGA1* równolegle w pozyskanej śródoperacyjnie tkance nowotworowej i krwi obwodowej pobranej od pacjentów z NDRP. Jej celem była ocena potencjalnej użyteczności oznaczania tej ekspresji, szczególnie we krwi, w prognozowaniu przebiegu NDRP.

Publikacja nr 1: Lias Saed, Ewa Olechnowicz, Ewa Balcerczak, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Znaczenie białek HMGA1, HMGA2 i HMGB1 oraz

ich genów w raku płuca. UMedical Reports 2021, 3, Łódź, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ISBN 978-83-961774-4-5, **MNiSW: 80**

Doktorant w publikacji dokonał przeglądu i wyboru piśmiennictwa oraz przygotował i korygował jej manuskrypt. Udział pozostałych autorów został przedstawiony w oświadczeniu znajdującym się na końcu niniejszej rozprawy doktorskiej.

Celem monografii było omówienie znaczenia wybranych białek z rodziny HMG: tj. *HMGA1*, *HMGA2* i *HMGB1*, oraz kodujących je genów w raku płuca. Część wprowadzająca monografii syntetycznie przedstawia epidemiologię, czynniki ryzyka i molekularne podstawy rozwoju raka płuca, jak również dostarcza krótkiej charakterystyki i podziału systematycznego rodziny białek HMG. Główna część monografii stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat znaczenia wymienionych trzech białek i kodujących je genów w procesie transformacji nowotworowej w raku płuca oraz użyteczności oceny ekspresji wymienionych genów i białek w prognozowaniu przebiegu i wyników terapii tego nowotworu. Przeważająca część danych przedstawionych w monografii wskazuje, że ekspresja genów *HMGA1*, *HMGA2* i *HMGB1*, jak również ilości kodowanych przez nie białek ulegają zwiększaniu w tkance raka płuca w stosunku do prawidłowych tkanek tego narządu, co wiąże się z funkcją tych białek w istotnych dla przebiegu nowotworzenia procesach proliferacji, apoptozy, migracji, przerzutowania, autofagii i neoangiogenezy. W pracy przedstawiono także udział mikroRNA w regulacji poziomu ekspresji wymienionych genów, jak również miejsce omawianych białek w szlakach sygnalizacyjnych kluczowych dla rozwoju raka płuc. Przedstawiono także nieliczne jak dotąd i sprzeczne dane dotyczące związku poziomu ekspresji genów *HMGA1*, *HMGA2* i *HMGB1* i ilości kodowanych przez nie białek w tkance guza nowotworowego z takimi cechami jak obecność przerzutów, stopień zaawansowania klinicznego, stopień zróżnicowania histologicznego, a także czasem przeżycia pacjentów, co stanowiło podstawę wyboru tematyki dalszych badań. Dodatkowo, przybliżono rolę omawianych genów i białek w odpowiedzi na chemioterapię w raku płuca.

Publikacja nr 2: **Lias Saed**, Agnieszka Jeleń, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Prognostic Significance of *HMGA1* Expression in Lung Cancer Based on

Bioinformatics Analysis. International Journal of Molecular Sciences 2022, 23, (13):6933. doi: 10.3390/ijms23136933. PMID: 35805937, PMCID: PMC9266824. **IF: 6,208, MNiSW: 140**

W publikacji doktorant opracował koncepcję badań, wybrał narzędzia badawcze, wykonał analizy oraz przygotował i korygował jej manuskrypt. Udział pozostałych autorów został przedstawiony w oświadczeniu znajdującym się na końcu niniejszej rozprawy doktorskiej.

Publikacja miała na celu zintegrowaną analizę publicznie dostępnych danych wielkoskalowych (m.in. Oncomine, TIMER2.0, TNMplot, UALCAN) dotyczących ekspresji genu *HMGAI* w raku płuca. Przeprowadzone analizy porównawcze wykazały, że *HMGAI* ulega nadekspresji zarówno w DRP, jak i NDRP, w porównaniu zarówno z sąsiednimi niezmiennymi nowotworowo tkankami płuc, jak i nienowotworowymi tkanką płuc osób zdrowych. Wykazano związek ekspresji *HMGAI* a poziomem metylacji tego genu w raku płuca. Podwyższona ekspresja *HMGAI* była związana z cechami kliniczno-patologicznymi, takimi jak płeć, wiek i stopień zaawansowania klinicznego. Wysoki poziom ekspresji *HMGAI* wiązał się z krótszym czasem przeżycia całkowitego i wolnego od progresji wśród pacjentów z gruczolakorakiem płuc, ale nie u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym płuc. Zbudowana sieć interakcji białko-białko ujawniła, że *HMGAI* może współpracować z białkami zaangażowanymi w starzenie się komórek i kontrolę cyklu komórkowego, regulację transkrypcji, przebudowę chromatyny oraz biosyntezę cholesterolu. Analizy wykazały, że nadekspresja *HMGAI* może być istotnym elementem kancerogenezy płuc i czynnikiem prognostycznym w tym nowotworze.

Publikacja nr 3: Lias Saed, Ewa Balcerczak, Mariusz Łochowski, Ewa Olechnowicz, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. *HMGAI* gene expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: preliminary report. Molecular Genetics and Genomics 2022, doi: 10.1007/s00438-022-01936-9. PMID: 35948739. **IF: 2,980, MNiSW: 100**

Doktorant w publikacji dokonał badania ekspresji badanego genu w tkance nowotworowej, analizował i opracował wyniki oraz przygotował i korygował

manuskrypt. Udział pozostałych autorów został przedstawiony w oświadczeniu znajdującym się na końcu niniejszej rozprawy doktorskiej.

Celem była ocena ekspresji genu *HMGA1* w grupie pacjentów z NDRP i ocena jej związku z wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi oraz czasem przeżycia chorych. Ekspresja genu została oznaczona w pobranej śródoperacyjnie tkance nowotworowej, jak i krwi obwodowej pobranej w czasie diagnozy oraz 100 dni i 1 rok po operacji usunięcia guza pierwotnego. Zaobserwowano, że średni poziom ekspresji *HMGA1* we krwi systematycznie zmniejszał się do momentu rozpoznania nowotworu do 1 roku po operacji. Poziom ekspresji *HMGA1* we krwi 1 rok po operacji był istotnie wyższy u palaczy w porównaniu z niepalącymi. Zaobserwowano tendencję do krótszego całkowitego czasu przeżycia u pacjentów, u których występował wysoki poziom ekspresji *HMGA1* mierzony we krwi 100 dni po operacji. Poziom ekspresji *HMGA1* w tkance guza nowotworowego nie był związany z cechami klinicznymi ani z całkowitym czasem przeżycia pacjentów z NDRP. Ponadto nie stwierdzono korelacji między poziomem ekspresji *HMGA1* mierzonym w tkance guza i w próbach krwi. Uzyskane wyniki sugerują, że poziom mRNA *HMGA1* we krwi może być obiecującym czynnikiem użytecznym w prognozowaniu przebiegu choroby w chorych z NDRP.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W niniejszej pracy poszukiwano odpowiedzi na pytanie, czy poziom ekspresji genu *HMGA1* może być czynnikiem prognostycznym w raku płuca, jak również czy oznaczanie poziomu *HMGA1* we krwi obwodowej u chorych z NDRP w czasie diagnozy i okresie pooperacyjnym może być czynnikiem użytecznym w przewidywaniu dalszego przebiegu choroby.

Uzyskane w wyniku realizacji niniejszej pracy doktorskiej wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących obserwacji i wniosków:

1. Poziom ekspresji genu *HMGA1* jest wyższy w tkance raka płuca, niezależnie od jego typu histologicznego, zarówno w porównaniu do przylegającej do guza tkanki prawidłowej, jak i prawidłowej tkanki płuc, co potwierdza istotny udział *HMGA1* w procesie nowotworzenia w tym narządzie.
2. Podwyższony poziom ekspresji *HMGA1* w tkance raka płuca może być wynikiem zmniejszonego poziomu metylacji genu *HMGA1*
3. Proonkogenne działanie podwyższonej ekspresji *HMGA1* może być związane z interakcją białka *HMGA1* z białkami zaangażowanymi w starzenie się komórek i kontrolę cyklu komórkowego, przebudowę chromatyny oraz biosyntezę cholesterolu.
4. Poziom ekspresji *HMGA1* w tkance nowotworowej jest związany ze stopniem zaawansowania klinicznego u pacjentów z NDRP, co wskazuje na potencjalną wartość prognostyczną tego poziomu.
5. Wysoki poziom ekspresja *HMGA1* wiąże się z krótszym całkowitym i wolnym od progresji czasem przeżycia pacjentów z gruczorakorakiem płuca, ale nie z rakiem płaskonabłonkowym płuca, co dowodzi, że znaczenie prognostyczne *HMGA1* może być ograniczone do wybranych podtypów histologicznych raka płuca.
6. Obserwacja, że poziom ekspresji genu *HMGA1* oznaczany we krwi obwodowej chorych z NDRP systematycznie zmniejszał się w okresie monitorowania badanych chorych, jak również zanotowana tendencja do krótszego całkowitego czasu przeżycia u pacjentów, u których występował wysoki poziom ekspresji *HMGA1* mierzony we krwi 100 dni po operacji, wskazują, że oznaczanie poziomu ekspresji *HMGA1* we krwi obwodowej u chorych z NDRP może być potencjalnie wykorzystane jako marker prognostyczny w tej jednostce chorobowej.

7. Uzyskane wyniki wskazują, że poziom ekspresji genu *HMGAI* w tkance nowotworowej może zostać potencjalnie wykorzystany w praktyce klinicznej jako czynnik prognostyczny u osób z rakiem płuca. Oznaczanie poziomu *HMGAI* we krwi obwodowej u chorych z NDRP w czasie diagnozy i okresie pooperacyjnym może być czynnikiem mogącym przewidywać dalszy przebieg tej choroby.

7. PIŚMIENNICTWO

1. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020: Lung fact sheet <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> (dostęp z dn. 10.02.2023)
2. Krajowy Rejestr Nowotworów. Podstawowe dane statystyczne za rok 2019. <https://onkologia.org.pl/pl> (dostęp z dn. 10.02.2023)
3. International Agency for Research on Cancer. Cancer Tomorrow <https://gco.iarc.fr/today/home> (dostęp z dn. 10.02.2023)
4. Chmielewska E. Nowotwory płuca. W: Kułakowski A. (red), Skowrońska-Gardas A. (red). Onkologia 2014, Warszawa, PZWL Wydawnictwo lekarskie, 2014, ISBN/ISSN: 978-83-200-2737-2
5. Krajowy Rejestr Nowotworów. Nowotwory płuca i opłucnej. Nowotwory płuca i opłucnej. Czynniki ryzyka. <https://onkologia.org.pl/pl/nnowotwory-pluca-i-oplucnej-czynniki-ryzyka> (dostęp z dn. 10.02.2023)
6. Kołodziej J.(red.), Marciniak M. (red.). Rak płuca 2010. ISBN: 9788362138319
7. Krzakowski M, Jassem J, Antczak A et al. Cancer of the lung, pleura and mediastinum. *Oncol Clin Pract* 2019; 15. DOI: 10.5603/OCP.2018.0056.
8. Reeves R, Beckerbauer L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta*. 2001 May 28;1519(1-2):13-29. doi: 10.1016/s0167-4781(01)00215-9. PMID: 11406267.
9. Evans A, Lennard TW, Davies BR. High-mobility group protein 1(Y): metastasis-associated or metastasis-inducing? *J Surg Oncol*. 2004 Nov 1;88(2):86-99. doi: 10.1002/jso.20136. PMID: 15499602.
10. Qi C, Cao J, Li M, Liang C, He Y, Li Y, Li J, Zheng X, Wang L, Wei B. HMGA1 Overexpression is Associated With the Malignant Status and Progression of Breast Cancer. *Anat Rec (Hoboken)*. 2018 Jun;301(6):1061-1067. doi: 10.1002/ar.23777. PMID: 29316384.
11. Jun KH, Jung JH, Choi HJ, Shin EY, Chin HM. HMGA1/HMGA2 protein expression and prognostic implications in gastric cancer. *Int J Surg*. 2015 Dec;24 (Pt A):39-44. doi: 10.1016/j.ijso.2015.10.031. PMID: 26537313.
12. Williams MD, Zhang X, Belton AS, Xian L, Huso T, Park JJ, Siems WF, Gang DR, Resar LM, Reeves R, Hill HH Jr. HMGA1 drives metabolic reprogramming of intestinal epithelium during hyperproliferation, polyposis, and colorectal carcinogenesis. *J Proteome Res*. 2015 Mar 6;14(3):1420-31. doi: 10.1021/pr501084s. PMID: 25643065.
13. Hillion J, Roy S, Heydarian M, Cope L, Xian L, Koo M, Luo LZ, Kellyn K, Ronnett BM, Huso T, Armstrong D, Reddy K, Huso DL, Resar LMS. The High Mobility Group A1 (HMGA1) gene is highly overexpressed in human uterine serous carcinomas and carcinosarcomas and drives Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) in a subset of tumors. *Gynecol Oncol*. 2016 Jun;141(3):580-587. doi:10.1016/j.ygyno.2016.03.020. PMID: 27001612; PMCID: PMC5770984.
14. Colamaio M, Tosti N, Puca F, Mari A, Gattardo R, Kuzay Y, Federico A, Pepe A, Sarnataro D, Ragozzino E, Raia M, Hirata H, Gemei M, Mimori K, Del Vecchio L, Battista S, Fusco A. HMGA1 silencing reduces stemness and temozolomide resistance in glioblastoma stem cells. *Expert Opin Ther Targets*. 2016 Oct;20(10):1169-79. doi: 10.1080/14728222.2016.1220543. PMID:27486901.

15. Li N, McNiff J, Hui P, Manfioletti G, Tallini G. Differential expression of HMGA1 and HMGA2 in dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans: potential diagnostic applications, and comparison with histologic findings, CD34, and factor XIIIa immunoreactivity. *Am J Dermatopathol.* 2004 Aug;26(4):267-72. doi: 10.1097/00000372-200408000-00001. PMID: 15249855.
16. Xu G, Wang J, Jia Y, Shen F, Han W, Kang Y. MiR-142-3p functions as a potential tumor suppressor in human osteosarcoma by targeting HMGA1. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(5):1329-39. doi: 10.1159/000358700. PMID: 24803022.
17. Wang Y, Hu L, Zheng Y, Guo L. HMGA1 in cancer: Cancer classification by location. *J Cell Mol Med.* 2019 Apr;23(4):2293-2302. doi: 10.1111/jcmm.14082. PMID: 30614613; PMCID: PMC6433663.
18. De Martino M, Fusco A, Esposito F. HMGA and Cancer: A Review on Patent Literatures. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2019;14(3):258-267. doi: 10.2174/1574892814666190919152001. PMID: 31538905.
19. Xian L, Georgess D, Huso T, Cope L, Belton A, Chang YT, Kuang W, Gu Q, Zhang X, Senger S, Fasano A, Huso DL, Ewald AJ, Resar LMS. HMGA1 amplifies Wnt signalling and expands the intestinal stem cell compartment and Paneth cell niche. *Nat Commun.* 2017 Apr 28;8:15008. doi: 10.1038/ncomms15008. PMID: 28452345; PMCID: PMC5414379.
20. Zu X, Zhong J, Tan J, Tan L, Yang D, Zhang Q, Ding W, Liu W, Wen G, Liu J, Cao R, Jiang Y. TGF- β 1 induces HMGA1 expression in human breast cancer cells: implications of the involvement of HMGA1 in TGF- β signaling. *Int J Mol Med.* 2015 Mar;35(3):693-701. doi: 10.3892/ijmm.2015.2062. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25572132; PMCID: PMC4314408.
21. Scrima M, De Marco C, Fabiani F, Franco R, Pirozzi G, Rocco G, Ravo M, Weisz A, Zoppoli P, Ceccarelli M, Botti G, Malanga D, Viglietto G. Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS One.* 2012;7(2):e30427. doi: 10.1371/journal.pone.0030427. PMID: 22363436; PMCID: PMC3281846.
22. Pallante P, Sepe R, Puca F, Fusco A. High mobility group a proteins as tumor markers. *Front Med (Lausanne).* 2015 Mar 25;2:15. doi: 10.3389/fmed.2015.00015. PMID: 25859543; PMCID: PMC4373383.
23. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007 Dec;7(12):899-910. doi: 10.1038/nrc2271. PMID: 18004397.
24. Ha TK, Her NG, Lee MG, Ryu BK, Lee JH, Han J, Jeong SI, Kang MJ, Kim NH, Kim HJ, Chi SG. Caveolin-1 increases aerobic glycolysis in colorectal cancers by stimulating HMGA1-mediated GLUT3 transcription. *Cancer Res.* 2012 Aug 15;72(16):4097-109. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0448. PMID: 22706202.
25. Zhou WB, Zhong CN, Luo XP, Zhang YY, Zhang GY, Zhou DX, Liu LP. miR-625 suppresses cell proliferation and migration by targeting HMGA1 in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Feb 19;470(4):838-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.122. PMID: 26806308.
26. Takahashi Y, Sawada G, Sato T, Kurashige J, Mima K, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, Ishibashi M, Takano Y, Akiyoshi S, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Tanaka J, Kudo SE, Doki Y, Mori M, Mimori K. Microarray analysis reveals that high mobility group A1 is involved in colorectal cancer metastasis. *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1488-96. doi: 10.3892/or.2013.2602. PMID: 23835740..
27. Chandrasekaran KS, Sathyanarayanan A, Karunakaran D. MicroRNA-214 suppresses growth, migration and invasion through a novel target, high mobility group AT-hook 1, in human cervical and colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 2016 Sep 6;115(6):741-51. doi: 10.1038/bjc.2016.234. PMID: 27537384; PMCID: PMC5023773.

28. Wisniewski JR, Schwanbeck R. High mobility group I/Y: multifunctional chromosomal proteins causally involved in tumor progression and malignant transformation (review). *Int J Mol Med*. 2000 Oct;6(4):409-19. doi: 10.3892/ijmm.6.4.409. PMID: 10998430.
29. Balcerczak M, Pasz-Walczak G, Balcerczak E, Wojtylak M, Kordek R, Mirowski M. HMGI(Y) gene expression in colorectal cancer: comparison with some histological typing, grading, and clinical staging. *Pathol Res Pract*. 2003;199(10):641-6. doi: 10.1078/0344-0338-00475. PMID: 14666966.
30. Huang R, Huang D, Dai W, Yang F. Overexpression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of breast cancer. *Mol Cell Biochem*. 2015 Jun;404(1-2):251-7. doi: 10.1007/s11010-015-2384-4. PMID: 25772486.
31. Hillion J, Wood LJ, Mukherjee M, Bhattacharya R, Di Cello F, Kowalski J, Elbahloul O, Segal J, Poirier J, Rudin CM, Dhara S, Belton A, Joseph B, Zucker S, Resar LM. Upregulation of MMP-2 by HMGA1 promotes transformation in undifferentiated, large-cell lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009 Nov;7(11):1803-12. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0336. PMID: 19903768; PMCID: PMC3069640.
32. Ma Y, Li X, Chen S, Du B, Li Y. MicroRNA-4458 suppresses migration and epithelial-mesenchymal transition via targeting HMGA1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Manag Res*. 2019 Jan 10;11:637-649. doi: 10.2147/CMAR.S185117. PMID: 30666160; PMCID: PMC6331073.
33. Barh D, Jain N, Tiwari S, Field JK, Padin-Iruegas E, Ruibal A, López R, Herranz M, Bhattacharya A, Juneja L, Viero C, Silva A, Miyoshi A, Kumar A, Blum K, Azevedo V, Ghosh P, Liloglou T. A novel in silico reverse-transcriptomics-based identification and blood-based validation of a panel of sub-type specific biomarkers in lung cancer. *BMC Genomics*. 2013;14 Suppl 6(Suppl 6):S5. doi: 10.1186/1471-2164-14-S6-S5. PMID: 24564251; PMCID: PMC3908344.
34. Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, Karjalainen A, Knuutila S, Anttila S. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol*. 2006 Jun;209(2):206-12. doi: 10.1002/path.1960. PMID: 16521118.
35. Zhang Z, Wang Q, Chen F, Liu J. Elevated expression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2015 Feb;36(2):1213-9. doi: 10.1007/s13277-014-2749-4. PMID: 25344216.
36. Kettunen E, Anttila S, Seppänen JK, Karjalainen A, Edgren H, Lindström I, Salovaara R, Nissén AM, Salo J, Mattson K, Hollmén J, Knuutila S, Wikman H. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004 Mar;149(2):98-106. doi: 10.1016/S0165-4608(03)00300-5. PMID: 15036884.
37. Wikman H, Kettunen E, Seppänen JK, Karjalainen A, Hollmén J, Anttila S, Knuutila S. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene*. 2002 Aug 22;21(37):5804-13. doi: 10.1038/sj.onc.1205726. PMID: 12173052.
38. He W, Ju D, Jie Z, Zhang A, Xing X, Yang Q. Aberrant CpG-methylation affects genes expression predicting survival in lung adenocarcinoma. *Cancer Med*. 2018 Nov;7(11):5716-5726. doi: 10.1002/cam4.1834. PMID: 30353687; PMCID: PMC6246931.
39. Zhou X, Zhang Z, Liang X. Regulatory Network Analysis to Reveal Important miRNAs and Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell J*. 2020 Jan;21(4):459-466. doi: 10.22074/cellj.2020.6281. PMID: 31376328; PMCID: PMC6722447.
40. Zhang Y, Ma T, Yang S, Xia M, Xu J, An H, Yang Y, Li S. High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells. *Mol*

- Cell Biochem. 2011 Nov;357(1-2):363-71. doi: 10.1007/s11010-011-0907-1. PMID: 21656127.
41. Panneerselvam J, Srivastava A, Muralidharan R, Wang Q, Zheng W, Zhao L, Chen A, Zhao YD, Munshi A, Ramesh R. IL-24 modulates the high mobility group (HMG) A1/miR222 /AKT signaling in lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016 Oct 25;7(43):70247-70263. doi: 10.18632/oncotarget.11838. PMID: 27602961; PMCID: PMC5342550.
 42. Sekimoto N, Suzuki A, Suzuki Y, Sugano S. Expression of miR-26a exhibits a negative correlation with HMGA1 and regulates cancer progression by targeting HMGA1 in lung adenocarcinoma cells. *Mol Med Rep*. 2017 Feb;15(2):534-542. doi: 10.3892/mmr.2016.6053. PMID: 28000891; PMCID: PMC5364888.
 43. Zhang R, Tao F, Ruan S, Hu M, Hu Y, Fang Z, Mei L, Gong C. The TGFβ1-FOXM1-HMGA1-TGFβ1 positive feedback loop increases the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by inducing G6PD expression. *Am J Transl Res*. 2019 Nov 15;11(11):6860-6876. PMID: 31814893; PMCID: PMC6895501.
 44. Wang YT, Pan SH, Tsai CF, Kuo TC, Hsu YL, Yen HY, Choong WK, Wu HY, Liao YC, Hong TM, Sung TY, Yang PC, Chen YJ. Phosphoproteomics Reveals HMGA1, a CK2 Substrate, as a Drug-Resistant Target in Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep*. 2017 Mar 14;7:44021. doi: 10.1038/srep44021. PMID: 28290473; PMCID: PMC5349541.
 45. Scala S, Portella G, Fedele M, Chiappetta G, Fusco A. Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 11;97(8):4256-61. doi: 10.1073/pnas.070029997. PMID: 10759549; PMCID: PMC18219.
 46. Lin SY, Peng F. Association of SIRT1 and HMGA1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2016 Jan;11(1):782-788. doi: 10.3892/ol.2015.3914. PMID: 26834854; PMCID: PMC4726940.

8. STRESZCZENIE

Rak płuca należy do najczęściej występujących, ale i najbardziej śmiertelnych nowotworów zarówno w Polsce, jak i w skali całego świata. Heterogenność genetyczna komórek raka płuc może determinować przebieg choroby oraz wyniki leczenia. Z tego względu poszukuje się nowych, doskonalszych niż obecne czynników prognostycznych i predykcyjnych dla tego nowotworu m.in. w obrębie zmian w sekwencji bądź ekspresji genów. Szczególnie cenne wydaje się znalezienie markerów, które mogłyby być oceniane w łatwo dostępnym materiale biologicznym, np. krwi obwodowej.

Celem prac doktorskiej była ocena wartości prognostycznej genu *HMGA1* w raku płuca. Gen ten koduje niehistonowe białko HMGA1, którego zadaniem jest regulowanie transkrypcji innych genów. Zarówno ekspresja genu *HMGA1*, jak i ilość białka HMGA1 jest często podwyższona w komórkach nowotworowych i koreluje z zaawansowaniem choroby. Dotychczas wykazano prognostyczną wartość poziomu ekspresji genu *HMGA1* w przypadku m.in. raka trzustki, żołądka, endometrium. Jednak wiedza na temat jego znaczenia w raku płuca jest wciąż niewielka.

Przeprowadzone analizy wykazały, że poziom ekspresji *HMGA1* jest istotnie wyższy w tkance raka płuca, niezależnie od jego typu histologicznego i może być potencjalnie użyteczny jako marker tkanki nowotworowej. Jest on także związany z płcią, wiekiem oraz stopniem zaawansowania klinicznego chorych z rakiem płuca. Wysoki poziom ekspresji *HMGA1* wiąże się krótszym całkowitymi i wolnym od progresji czasem przeżycia pacjentów w gruczorakorakiem płuc, ale zależności takiej nie potwierdzono wśród chorych z rakiem płaskonabłonkowym. Udział białka HMGA1 w procesie nowotworzenia może być związany z jego funkcjonalną interakcją z białkami ważnymi dla regulacji cyklu komórkowego, regulującymi transkrypcję, modelującymi chromatynę czy biorącymi udział w syntezie cholesterolu.

Zaobserwowano, że poziom ekspresji *HMGA1* we krwi obwodowej pacjentów z NDRP monitorowany z momencie diagnozy, 100 dni i 1 rok po operacji zmniejszał się systematycznie w czasie. Poziom ekspresji *HMGA1* we krwi rok po operacji był istotnie wyższy u palaczy. Zaobserwowano też tendencję krótszego całkowitego czasu przeżycia w chorych z NDRP, którzy posiadali wysoki poziom ekspresji *HMGA1* mierzony we krwi 100 dni po operacji.

Przeprowadzone badania pozwalają na stwierdzenie, że gen *HMGA1* jest istotnym czynnikiem biorącym udział w procesie nowotworzenia w tkance płuc, a oznaczenie poziomu jego ekspresji zarówno w tkance nowotworowej, jak i krwi obwodowej posiada wartość prognostyczną u pacjentów z NDRP.

9. ABSTRACT

Lung cancer is one of the most common, but also the most deadly cancers, both globally and in Poland. Genetic heterogeneity of lung cancer cells may determine the course of the disease and the outcome of treatment. For this reason, new, better than the current prognostic and predictive factors for this cancer are being searched, e.g. within changes in the sequence or expression of genes. It seems particularly valuable to find markers that could be assessed in readily available biological material like peripheral blood.

The aim of the doctoral thesis was to assess the prognostic value of the *HMGA1* gene in lung cancer. This gene encodes the non-histone protein HMGA1, whose function is to regulate the transcription of other genes. Both the expression of the *HMGA1* gene and the amount of the HMGA1 protein are often elevated in cancer cells and correlate with the severity of the disease. So far, the prognostic value of the level of *HMGA1* gene expression has been demonstrated in the case of e.g. pancreatic, stomach and endometrial cancer. However, little is known about its role in lung cancer.

The conducted analyzes showed that the level of *HMGA1* expression is significantly higher in lung cancer tissue, regardless of its histological type, and may be potentially useful as a marker of neoplastic tissue. It is also related to sex, age and clinical stage of patients with lung cancer. High levels of *HMGA1* expression are associated with shorter overall and progression-free survival in patients with lung adenocarcinoma, but such a relationship has not been confirmed in patients with squamous cell carcinoma. The participation of the HMGA1 protein in the process of carcinogenesis may be associated with its functional interaction with proteins important for the regulation of the cell cycle, regulating transcription, modeling chromatin, or synthesis of cholesterol.

It was observed that the level of *HMGA1* expression in the peripheral blood of NSCLC patients monitored at the time of diagnosis, 100 days and 1 year after surgery decreased systematically over time. The level of *HMGA1* expression in the blood one year after surgery was significantly higher in smokers. There was also a trend of shorter overall survival in NSCLC patients who had high levels of *HMGA1* expression measured in blood 100 days after surgery. The conducted research allows for the

conclusion that the *HMGA1* gene is an important factor involved in the process of carcinogenesis in the lung tissue, and the determination the level of its expression both in the neoplastic tissue and in the peripheral blood has a prognostic value in patients with NSCLC.

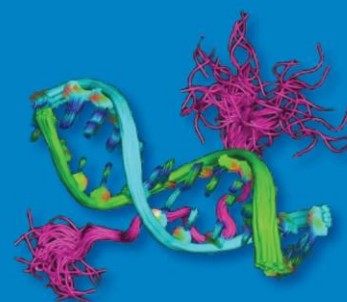
10. KOPIE ARTYKUŁÓW STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI

3 | 2021

UTR | UMEDICAL
REPORTS

LIAS SAED, EWA OLECHNOWICZ,
EWA BALCERCZAK, MAREK MIROWSKI,
ALEKSANDRA SAŁAGACKA-KUBIAK*

ZNACZENIE BIAŁEK HMGA1, HMGA2 I HMGB1 ORAZ ICH GENÓW W RAKU PŁUCA



Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

ŁÓDŹ 2021

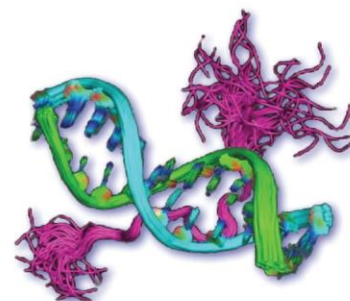
LIAS SAED , EWA OLECHNOWICZ,
EWA BALCERCZAK , MAREK MIROWSKI ,
ALEKSANDRA SAŁAGACKA-KUBIAK* 

ZNACZENIE BIAŁEK HMGA1, HMGA2 I HMGB1 ORAZ ICH GENÓW W RAKU PŁUCA

THE IMPORTANCE OF HMGA1, HMGA2
AND HMGB1 PROTEINS AND THEIR GENES
IN LUNG CANCER

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej,
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi;
lias.saed@stud.umed.lodz.pl, e_olechnowicz@interia.pl, ewa.balcerczak@umed.lodz.pl,
marek.mirowski@umed.lodz.pl, aleksandra.salagacka@umed.lodz.pl

* e-mail: aleksandra.salagacka@umed.lodz.pl



Seria monografii naukowych dotyczących zagadnień z zakresu dyscyplin nauk farmaceutycznych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wydawnictwo recenzowane i punktowane na zasadach zgodnych z Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 lutego 2019 r. w sprawie ewaluacji jakości działalności naukowej (Dz.U. 2019 poz. 392 z późn. zm.).

RADA NAUKOWA

dr hab. Monika A. Olszewska, prof. uczelni – Redaktor naczelna
prof. dr hab. Monika Łukomska-Szymańska – Zastępca redaktor naczelnej
prof. dr hab. Iwona Cygankiewicz
dr hab. Małgorzata Pikala, prof. uczelni

REDAKTOR PROWADZĄCA

dr hab. Monika A. Olszewska, prof. uczelni

KOREKTA

Magdalena Kokosińska, Anna Sikorska

OPRACOWANIE GRAFICZNE

Tomasz Przybył

ZNACZENIE BIAŁEK HMGA1, HMGA2 I HMGB1 ORAZ ICH GENÓW W RAKU PŁUCA
Łódź 2021

WYDAWNICTWO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

<http://wydawnictwo.umed.pl/>

[e-mail: editorial@reports.umed.pl](mailto:editorial@reports.umed.pl)

Unikatowy identyfikator Wydawnictwa: 60000

(Komunikat Ministra Edukacji i Nauki z dnia 22 lipca 2021 r. w sprawie wykazu wydawnictw publikujących recenzowane monografie naukowe)

ISBN

ISBN 978-83-961774-4-5

WYDANIE PIERWSZE



© 2021. Pewne prawa zastrzeżone na rzecz autorów. Opublikowane na licencji Creative Commons Uznanie Autorstwa (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.pl>).
Licencjodawca: Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zezwala się na wykorzystanie treści monografii zgodnie z licencją – pod warunkiem zachowania niniejszej informacji licencyjnej oraz wskazania autorów jako właścicieli praw do tekstu.

Streszczenie: Rak płuca należy do najczęściej rozpoznawanych nowotworów złośliwych i odpowiada za największy odsetek zgonów z powodu nowotworów na świecie. Liczne badania dowodzą istotnej roli białek o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (ang. *high mobility group*, HMG) w procesie nowotworzenia w płucach. Białka HMG to grupa niehistonowych białek chromatynowych, zaangażowanych m.in. w regulację procesów transkrypcji, replikacji i naprawy DNA. Wykazano, że istnieje tendencja do wyraźnego wzrostu ekspresji genów *HMG* oraz ilości kodowanych przez nie białek w raku płuca w stosunku do tkanki niezmięnionej nowotworowo. Badania *in vitro* i *in vivo* dostarczają dowodów, że białka te mogą uczestniczyć w procesie transformacji nowotworowej tkanki płucnej, nasilać proliferację, inwazyjność i zdolność do przerzutowania komórek. Poziom ekspresji wybranych genów i białek HMG jest związany z cechami kliniczno-patologicznymi raka płuca, takimi jak obecność przerzutów, stopień zaawansowania klinicznego, stopień zróżnicowania histologicznego, jak również z czasem przeżycia pacjentów. W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat ekspresji genów *HMGA1*, *HMGA2* i *HMGB1* i kodowanych przez nie białek w nowotworach płuca oraz jej znaczenia w procesie transformacji nowotworowej w tym narządzie. Zebrano także wyniki dotychczasowych badań nad użytecznością oceny ekspresji w prognozowaniu przebiegu raka płuca i jej ewentualnego wykorzystania w terapii tego nowotworu.

Słowa kluczowe: białka HMG, *HMGA1*, *HMGA2*, *HMGB1*, rak płuca, ekspresja genu, prognoza, terapia

Abstract: Lung cancer is one of the most frequently diagnosed malignant neoplasms accounting for the highest percentage of cancer deaths in the world. Numerous studies prove the significant role high mobility group (HMG) proteins play in the lung carcinogenesis. HMG proteins are a group of non-histone chromatin proteins involved, among others, in regulating the processes of transcription, replication and DNA repair. It has been shown that there is a tendency for a marked increase of the expression of HMG genes and the amount of proteins encoded by them in lung cancer as compared to non-cancerous lung tissue. In vitro and in vivo studies provide evidence that these proteins can participate in the process of neoplastic transformation of lung tissue, increase the proliferation, invasiveness and metastasis of lung cells. The level of expression of selected genes and proteins belonging to the HMG family is associated with the clinical and pathological features of lung cancer, such as the presence of metastases, clinical advancement, degree of histological differentiation, as well as the survival time of patients. The paper presents the current state of knowledge on the expression of HMGA1, HMGA2 and HMGB1 genes and proteins encoded by them in lung tumours and its significance in the process of neoplastic transformation in the lungs. It also includes the results of existing research on the usefulness of expression in the prognosis of the course of lung cancer and its possible use in the therapy of the disease.

Keywords: HMG proteins, HMGA1, HMGA2, HMGB1, lung cancer, gene expression, prognosis, therapy

Spis treści

1. Wprowadzenie	10
2. Gen <i>HMGA1</i> i białko HMGA1.....	12
3. Gen <i>HMGA2</i> i białko HMGA2.....	16
4. Gen <i>HMGB1</i> i białko HMGB1.....	20
5. Podsumowanie	27
Bibliografia.....	29

Wykaz skrótów:

AKT – kinaza białek B
ANG (ang. *angiogenin*) – angiogenina, rybonukleazy z nadrodziny RNaz A
AP1 – czynnik transkrypcyjny
APC (ang. *adenomatous polyposis coli*) – białko kodowane przez gen supresorowy APC
 $\alpha v \beta 3$ – integryna
 α -SMA (ang. *α -smooth muscle actin*) – aktyna alfa
BAX (ang. *BCL-2-associated X protein*) – białko apoptotyczne
BCL-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*) – białko apoptotyczne
Beclin1-PI3K-III – kompleks białkowy
CDK2 (ang. *cyclin-dependent-kinase 2*) – kinaza zależna od cyklin 2
CXCR4 (ang. *C-X-C chemokine receptor type 4*) – receptor chemokin CXC, typ 4
CXCL11 (ang. *chemokine receptor ligand 11*) – ligand receptora chemokin CXC, typ 11
c-Myc – czynnik transkrypcyjny kodowany przez protoonkogen MYC
DAMP (ang. *damage-associated molecular pattern*) – struktury molekularne związane z uszkodzeniem, alarminy
DICER1 – gen kodujący endorybonukleazę DICER
EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu
EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu
eIF2 α (ang. *eukaryotic Initiation Factor 2 alpha*) – czynnik inicjujący translację
EMT (ang. *epidermal-mesenchymal transition*) – przejście nabłonkowo-mezenchymalne
Erk1/2 (ang. *mitogen-activated protein kinase 3/ mitogen-activated protein kinase 1*) – ścieżka sygnalizacji komórkowej
E2F1 – czynnik transkrypcyjny
FAK (ang. *focal adhesion kinase*) – kinaza ogniskowo-adhezyjna
FOS – czynnik transkrypcyjny
FOXM1 (ang. *forkhead box protein M1*) – czynnik transkrypcyjny
FOXM1/HMGA1/G6PD (ang. *forkhead box protein M1-high mobility group AT-hook 1-G6PD*) – ścieżka regulacji transkrypcyjnej
Fzd2 (ang. *frizzled homolog 2*) – białko mysie, działające antagonistycznie do ścieżki WNT
GADD153 (ang. *growth arrest and DNA damage-inducible protein*) – czynnik transkrypcyjny
Gata6 (ang. *GATA-binding protein 6*) – białko mysie, czynnik transkrypcyjny
GSK3 β (ang. *glycogen synthase kinase 3 beta*) – kinaza syntazy glikogenu 3 beta
GSKIP (ang. *glykogen synthase kinase 3 beta interacting protein*) – białko regulujące GSK3 β
G6PD – dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa
HMG (ang. *high mobility group proteins*) – białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej
HMGA – rodzina białek HMG kodowanych przez geny HMGA
HMGB – rodzina białek HMG kodowanych przez geny HMGB
HMGB1/RAGE (ang. *high mobility group protein B1 – receptor for advanced glycation end products*) – ścieżka sygnalizacji komórkowej
HMGN – rodzina białek HMG kodowana przez geny HMGN
IL-24 – interleukina 24
IRE1 α – endorybonukleaza

JAK3 – kinaza białkowa
JAK/STAT (ang. *janus kinase-signal transducer and activator of transcription protein*) – ścieżka sygnalizacji komórkowej
JUN – czynnik transkrypcyjny
JUN-B – czynnik transkrypcyjny
KRAS – protoonkogen
let-7 – rodzina cząsteczek mikroRNA
LIN28B (ang. *Lin-28 homolog B*) – gen kodujący białko LIN28B
MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) – kinaza aktywowana mitogenami
MAPK/ERK1/2 (ang. *mitogen-activated protein kinase – extracellular signal-regulated kinase*) – ścieżka sygnalizacji komórkowej
MCL-1 (ang. *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) – białko apoptotyczne
MEK/ERK1 – ścieżka sygnalizacji komórkowej MAPK/ERK1/2
miR – mikroRNA
MMP (ang. *matrix metalloproteinase*) – metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej
MUC1-C – białko transbłonowe
MYC – protoonkogen, kodujący czynnik transkrypcyjny MYC
MYCN – protoonkogen, kodujący czynnik transkrypcyjny N-MYC
MYCN-LIN28B-LET7-HMGA2-CDKN2 – ścieżka regulacyjna
NAC1 (ang. *nucleus accumbens-associated protein 1*) – czynnik transkrypcyjny
NF-κB (ang. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) – czynnik transkrypcyjny
NSCLC (ang. *non-small cell lung cancer*) – niedrobnokomórkowy rak płuca
pAKT – fosforylowane białko AKT
PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) – antygen jądrowy komórek proliferujących
PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu
p-ERK – fosforylowana forma ERK
PGF (ang. *placental growth factor*) – łożyskowy czynnik wzrostu
P53 – czynnik transkrypcyjny o właściwościach supresora nowotworowego
P65 – czynnik transkrypcyjny, podjednostka NF-κB
P73 – białko jądrowe
PI3K (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase*) – gen fosfatazy fosfatydyloinozytolu 3
PI3K/AKT/mTOR (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase-mechanistic target of rapamycin*) – ścieżka sygnalizacji komórkowej
PP4R1 (ang. *protein phosphatase 4 regulatory subunit 1*) – podjednostka regulatorowa 1 fosfatazy białek 4
PPP2R2A (ang. *protein phosphatase, phosphatase A2 subunit B*) – podjednostka B fosfatazy A2
p38/MAPK – ścieżka sygnalizacji komórkowej
RAGE (ang. *receptor for advanced glycation end-products*) – receptor przezbłonowy
RAS/RAF/MEK/ERK – ścieżka sygnalizacji komórkowej MAPK/ERK
RB1 – gen supresorowy
siRNA (ang. *small interfering RNA*) – mały interferujący RNA, krótki interferujący RNA
SIRT1 (ang. *sirtuin 1, silent mating type information regulation 2 homolog 1*) – sirtuina 1

SLUG – czynnik transkrypcyjny, SNAI2
SNAI1 – czynnik transkrypcyjny
SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu
STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*) – czynnik transkrypcyjny
TGFβ1 (ang. *transforming growth factor beta 1*) – transformujący czynnik wzrostu beta 1
TGFβ1 /FOXM1/HMGA1/ TGFβ1 – komórkowa oś regulatorowa
TLR4 (ang. *toll-like receptor 4*) – receptor toll-podobny 4
TLR9 (ang. *toll-like receptor 9*) – receptor toll-podobny 9
TNM (ang. *tumour-lymph nodes-metastasis*) – klasyfikacja TNM
TP53 – gen supresorowy
Twist1 (ang. *Twist-related protein 1*) – czynnik transkrypcyjny
UTR (ang. *untranslated region*) – region mRNA nie podlegający translacji
VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
VIM (ang. *vimentin*) – gen kodujący wimentynę
Wnt – mysie glikoproteiny sygnałowe
WNT/β-katenina – ścieżka sygnalizacji komórkowej

1. Wprowadzenie

Według danych opublikowanych na portalu The Global Cancer Observatory rak płuca stanowi 11,4% wszystkich nowotworów złośliwych rozpoznanych na świecie w roku 2020. Tym samym był drugim po raku piersi nowotworem złośliwym pod względem liczby nowo rozpoznanych przypadków. Niemal co piąty zgon (18%) z powodu nowotworu złośliwego na świecie w 2020 roku był spowodowany rakiem płuca. W centralnej i wschodniej Europie choroba ta dotyka ponad cztery razy częściej mężczyzn niż kobiety (odpowiednio 49,0 i 11,6 przypadków na 100 000 mieszkańców). W 2020 r. umieralność w tej części Europy wyniosła 22,7/100 000 i była nieco wyższa niż umieralność na świecie (18/100 000) (The Global Cancer Observatory International Agency for Research on Cancer, 2020).

W Polsce rak płuca nadal pozostaje najczęstszym nowotworem złośliwym (14% zachorowań i 24% zgonów nowotworowych). Według danych zgromadzonych przez Krajowy Rejestr Nowotworów w latach 2014–2016 w Polsce 50% pacjentów z rakiem płuca rozpoczęło leczenie w stadium uogólnionym choroby, 30% w stadium regionalnym, a jedynie 19% w stadium miejscowym. Stąd m.in. rokowania pacjentów z rakiem płuca są gorsze niż chorych na inne często występujące nowotwory. Wśród pacjentów zdiagnozowanych w latach 2014–2016 i obserwowanych do końca 2018 roku 3-letnie wskaźniki przeżyć względnych wynosiły jedynie 17% dla mężczyzn i 24% dla kobiet (Didkowska i in., 2020).

Rzeczywisty rozwój raka płuca jest procesem wieloletnim i wieloetapowym. Inicjacja procesu nowotworowego zachodzi między innymi poprzez narażenie organizmu na działanie czynników kancerogennych, głównie tych zawartych w dymie tytoniowym. Rak płuca występował rzadko przed XX wiekiem, a istniejące obecnie światowe zróżnicowanie zachorowalności na ten nowotwór wynika w dużym stopniu z historycznych różnic w rozpowszechnieniu i ograniczeniu palenia tytoniu (Thun i in., 2012). U palacza występuje 10–30-krotnie wyższe ryzyko zachorowania niż u osoby niepalącej. Również bierne palenie zwiększa ryzyko rozwoju tego nowotworu. Zawarte w dymie papierosowym związki chemiczne z grupy policyklicznych węglowodorów aromatycznych (m.in. benzopiren, dwubenzopiren, benzoantracen, metylochryzen i nitronaftalen), jak również aminy aromatyczne i Polon 210 można zaliczyć do grupy związków kancerogennych (Grzelewska-Rzymowska, 2003). Powstają one z nieaktywnych związków o charakterze prokancerogenów na skutek ich metabolizmu (głównie hydroksylacji) przez monoooksygenazy z rodziny cytochromów P-450, zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym komórek płuc. Na przykład benzopiren metabolizowany jest do silnie elektrofilowego diolu epoksydu, łatwo atakującego nukleofilowe miejsca w zasadach DNA. Prowadzi to do tworzenia się adduktów i w konsekwencji do uszkodzeń w łańcuchu kwasu nukleinowego. Zmiany te mogą powodować amplifikację genów lub zapoczątkowywać powstawanie aberracji chromosomowych, co z kolei może prowadzić do transformacji nowotworowej. Rak płuca może być również indukowany na skutek zawodowej ekspozycji na azbest, radon, promieniowanie jonizujące i zanieczyszczenia atmosferyczne oraz niektóre metale: ołów, kadm, arsen, nikiel. Jego rozwojowi mogą także sprzyjać czynniki hormonalne i predyspozycje genetyczne (Marcinak i Kołodziej, 2010).

Do molekularnych czynników transformacji nowotworowej w raku płuca zalicza się geny odpowiedzialne m.in. za kontrolę cyklu komórkowego i różnicowanie się komórek. Należą do nich protoonkogeny (*KRAS*, *MYC*) i geny supresorowe (*RB1*, *TP53*), geny kodujące białka biorące udział w naprawie DNA, geny odpowiedzialne za kodowanie enzymów metabolizujących ksenobiotyki oraz

geny kodujące białka z rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*). W transformacji nowotworowej raka płuca istotna jest nadekspresja receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*). Receptor ten ma aktywność kinazy tyrozynowej, który po połączeniu z EGF ulega dimeryzacji i przekazuje sygnał do podziału komórki, co prowadzi do zwiększania masy nowotworu. Stała stymulacja receptora prowadzi do progresji nowotworu. Na tym etapie dochodzi do aktywacji istotnych czynników stymulujących proces angiogenezy, jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) lub łożyskowy czynnik wzrostu (PGF, ang. *placental growth factor*) (Marcinak i Kołodziej, 2010). Powstają nowe naczynia krwionośne i limfatyczne, niezbędne do dostarczania substancji odżywczych rosnącemu nowotworowi. Następuje także wzrost ilości białek enzymatycznych hydrolizujących błony podstawne komórek. Ostatecznie umożliwia to komórkom nowotworowym ich proteolityczne odrywanie od masy guza i formowanie przerzutów.

Białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (HMG, ang. *high mobility group proteins*) to duża grupa niehistonowych białek chromosomowych zaangażowanych w procesy transkrypcji, replikacji, rekombinacji i naprawy DNA. Na podstawie obecności w ich budowie charakterystycznych domen funkcjonalnych zostały one podzielone na trzy rodziny: HMGA, HMGB i HMGN. Białka rodziny HMGA [wcześniej HMG-I(Y)] kodowane są przez dwa geny: *HMGA1* (6p21.31) i *HMGA2* (12q14.3). Alternatywne cięcia i składanie transkryptu genu *HMGA1* skutkuje powstaniem białek HMGA1a, HMGA1b i HMGA1c. Gen *HMGA2* koduje białko HMGA2 wykazujące znaczne podobieństwo sekwencji z białkami HMGA1a i HMGA1b. Cechą wspólną białek HMGA jest obecność w ich budowie trzech niezależnych domen (ang. *AT-hook*), które wiążą się z mniejszą bruzdą podwójnej helisy DNA w regionach promotorów i sekwencji wzmacniających transkrypcję genów, bogatych w sekwencje AT. W każdej domenie można wyróżnić sekwencję palindromową prolina-arginina-glicyna-arginina-prolina (P-R-G-R-P) otoczoną poprzez inne dodatnio naładowane reszty aminokwasowe (Balcerczak i in., 2005; Reeves i Beckerbauer, 2001).

Rodzina HMGB (wcześniej HMG-1 i -2) reprezentowana jest przez cztery białka: od HMGB1 do HMGB4. Członkowie tej rodziny charakteryzują się obecnością w swojej budowie dwóch domen wiążących DNA (ang. *HMG-box*, *B-box*) o kształcie przypominającym bumerang, które powstają poprzez fałdowanie trzech helis rozdzielonych polipeptydowymi pętlami. Podobnie jak białka HMGA, mają one zdolność wiązania się do mniejszej bruzdy DNA, lecz interakcja ta nie jest specyficzna względem sekwencji nukleotydowej (Reeves i Adair, 2005).

Do rodziny HMGN (wcześniej HMG-14 i -17) zaliczono dotąd pięć białek oznaczonych od HMGN1 do HMGN5. Każda cząsteczka HMGN posiada trzy domeny funkcjonalne: dwudzielną domenę lokalizacji jądrowej, domenę wiążącą cząsteczki rdzenia nukleosomu i domenę transaktywacji / rozwijania chromatyny. W odróżnieniu od białek HMG z rodzin A i B, które preferencyjnie łączą się z zagiętymi lub odkształconymi fragmentami DNA, białka z rodziny N wiążą się z nukleosomami bez specyficzności względem sekwencji DNA. Osłabiają w ten sposób wiązanie histonów H1 do nukleosomów i przez to wpływają na strukturę chromatyny (Nanduri i in., 2020; Reeves i Adair, 2005).

Białka niehistonowe HMG są nazywane dodatkowymi „czynnikami architektonicznymi”, ponieważ powodują prostowanie, zginanie, rozwijanie bądź tworzenie się pętli DNA w miejscu jego wiązania lub modulują strukturę nukleosomu i chromatyny. Regulują bądź ułatwiają procesy jądrowe zależne od DNA, a tym samym wpływają na fenotypy komórkowe. Koordynują także udział

innych białek w transkrypcji, replikacji i naprawie DNA. Regulują aktywność transkrypcyjną genów uczestniczących w różnicowaniu komórek, cyklu komórkowym, migracji komórek i ich transformacji oraz apoptozie. Uczestniczą także w procesie integracji retrowirusów *in vitro* (Reeves i Beckerbauer, 2001).

Geny *HMGA1* i *HMGA2* ulegają ekspresji podczas embriogenezy, natomiast ich ekspresja jest niska bądź niewykrywalna w dojrzałych, zróżnicowanych tkankach (Vignali i Marracci, 2020). Do powtórnego uaktywnienia tych genów dochodzi podczas procesu nowotworzenia. Nadekspresja genów *HMGA1* i/lub *HMGA2* była stwierdzana m.in. w raku piersi, jelita grubego, jajnika i trzustki. W nowotworach tych białka HMGA uczestniczą w kluczowych dla procesu transformacji szlakach sygnalizacyjnych, jak WNT/ β -katenina, PI3K/AKT czy RAS/RAF/MEK/ERK (Pallante i in., 2015). Ich onkogenne działanie wiąże się ze zdolnością do indukowania czynników transkrypcyjnych E2F1 i AP1, indukowania ekspresji cykliny A, inaktywowania apoptozy zależnej od P53, zaburzania procesu naprawy DNA, nasilania ekspresji białek prozapalnych czy modulowania ekspresji genów zaangażowanych w proces przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *epidermal-mesenchymal transition*) (Fusco i Fedele, 2007). Niemal dla wszystkich nowotworów złośliwych potwierdzono związek nadekspresji genów *HMGA* z wysokim stopniem złośliwości, opornością na chemioterapię, tendencją do przerzutowania i niską przeżywalnością chorych (Pallante i in., 2015).

W odróżnieniu od białek z rodziny HMGA białko HMGB1 jest obecne w niemal wszystkich komórkach organizmów eukariotycznych. Jego funkcje istotnie zależą od jego lokalizacji komórkowej. Występujące w jądrze komórkowym HMGB1 wiąże się do DNA i tworzy kompleksy z białkami jądrowymi, m.in. P53, P73. Stabilizuje strukturę nukleosomów, reguluje ekspresję genów, bierze udział w naprawie DNA. Wydzielane aktywnie za pośrednictwem lizosomów poza komórkę bądź z ulegających nekrozie komórek nowotworowych jest cząsteczką stymulującą aktywność komórek układu odpornościowego. Podwyższone ilości białka HMGB1 w komórkach nowotworowych, jak i we krwi były stwierdzane u chorych na różnego rodzaju nowotwory (Ding i in., 2017; Smolarczyk i in., 2012; Wu i Yang, 2018; Wu i in., 2018a).

W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy na temat znaczenia białek HMGA1, HMGA2 i HMGB1 oraz kodujących je genów w procesie transformacji nowotworowej w raku płuca. Zebrano także wyniki badań nad użytecznością ekspresji wymienionych genów i białek w prognozowaniu przebiegu i terapii tego nowotworu.

2. Gen *HMGA1* i białko HMGA1

Nadekspresja genu *HMGA1*, jak i podwyższone poziomy kodowanego przez ten gen białka zostały potwierdzone w wielu różnych liniach komórkowych raka płuca (H1299, SK-MES-1, H460, H358, H125, H82, H661, U-1752) w porównaniu z prawidłowym nabłonkiem oskrzeli (Hillion i in., 2009; Ma i in., 2019). Również większość badanych pierwotnych guzów płuca wykazywała wyższą ekspresję genu *HMGA1* niż prawidłowa tkanka płuc (Barh i in., 2013; Hillion i in., 2009; Ma i in., 2019). Poprzez analizę danych mikromacierzowych dla 60 par pooperacyjnej tkanki niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC, ang. *non-small cell lung cancer*) i przylegającej prawidłowej tkanki płuca zgromadzonych w bazie Gen Expression Omnibus Zhang i wsp. (2015b) wykazali, że ekspresja genu *HMGA1* była istotnie wyższa w tkance zmienionej nowotworowo, a wynik ten potwierdzili w badaniu własnym techniką real-time PCR w próbach pobranych od chorych z NSCLC. Również ilość białka

HMGA1 badana techniką immunohistochemiczną okazała się być istotnie większa w tkance nowotworowej niż prawidłowej.

W raku płaskonabłonkowym płuca metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej stwierdzono amplifikację regionu 6p12~p21.1, gdzie położony jest ulegający nadekspresji gen *HMGA1* (Kettunen i in., 2004). Prawdopodobnie wysoka ekspresja genu *HMGA1* jest zjawiskiem powszechnym, niezależnym od typu histologicznego raka płuca. Profilowanie za pomocą mikromacierzy cDNA wykazało, że *HMGA1* jest jednym z genów, które powszechnie ulegają nadekspresji zarówno w raku płaskonabłonkowym, jak i gruczolakoraku płuca (Kettunen i in., 2004; Wikman i in., 2002). Co ciekawe, rearanżacje chromosomowe obejmujące geny *HMGA* były opisywane w łagodnych zmianach nienowotworowych płuca (hamartoma), w których stwierdzano indukcję tych genów (Kaysner i in., 2003). Obecność białka HMGA1 w jądrach komórkowych w większości badanych tkanek raka płuca, niezależnie od typu histologicznego, stwierdzili również Sarhadi i wsp. (2006). Korelowała ona pozytywnie z poziomem ekspresji *HMGA1a* i *HMGA1b* w badaniu półilościowym RT-PCR. Ekspresji tej nie stwierdzono natomiast w tkance prawidłowej płuca. Obecność pozytywnie barwiących się komórek zaobserwowano natomiast w nabłonku oskrzeli o cechach hiperplazji, metaplazji i dysplazji, co świadczyć może, że białko HMGA1 bierze udział już we wczesnych etapach procesu nowotworowego. Podwyższoną ekspresję genu *HMGA1* stwierdzono także we krwi chorych z NSCLC, zarówno w raku płaskonabłonkowym, jak i gruczolakoraku – w porównaniu z osobami zdrowymi (Barh i in., 2013).

Dokładna rola genu *HMGA1* w patogenezie raka płuca nie została jeszcze dobrze poznana. Dotychczasowe badania dostarczają dowodów, że gen *HMGA1* może być odpowiedzialny za zaburzenie funkcjonowania kluczowych szlaków sygnałowych, co prowadzi do rozwoju wielu nowotworów, w tym raka płuca (Pallante i in., 2015). Profilowanie RNA techniką mikromacierzy przeprowadzone w komórkach nabłonka oskrzelowego wykazujących ekspresję zmutowanego genu *PI3K* dowiodło, że białko HMGA1 jest elementem zespołu czynników transkrypcyjnych związanych z nieprawidłową sygnalizacją w szlaku PI3K/AKT w raku płuca. Komórki pochodzące z NSCLC (A549, NCI-H460, NCI-H596, NCI-H226, CALU1) z aktywowanym białkiem AKT wykazywały wyższą ekspresję genu *HMGA1* niż komórki z niską aktywnością AKT (NCI-H522, NCI-H23, BEN1). Badacze sugerują, że białko HMGA1 – obok czynników MYC, JUN, JUN-B i FOS – jest jednym z głównych węzłów wspólnej sieci molekularnej, które są pobudzone przez konstytutywną sygnalizację PI3K (Scrima i in., 2012).

Analizy bioinformatyczne wykazały, że *HMGA1* jest jednym z dziesięciu głównych genów należących do sieci wzajemnych oddziaływań miRNA–geny, która może być kluczowa w patogenezie NSCLC. Gen *HMGA1* wchodzi w interakcje m.in. z miR-16-5p i miR-222-3p (Zhou i in., 2020). Wyniki tych badań potwierdziły wcześniejsze obserwacje Zhang i wsp. (2011), którzy wykazali, że białko HMGA1 posiada kilka miejsc wiązania w obrębie promotora miR-222, a łącząc się z nim bezpośrednio w komórkach NSCLC – zwiększa aktywność transkrypcyjną miR-222, zmniejsza aktywność PPP2R2A (ang. *protein phosphatase, phosphatase A2 subunit B*) i w konsekwencji pobudza ścieżkę sygnałową zależną od pAKT. Dodatkowo indukcja ekspresji IL-24, cytokiny o właściwościach supresora nowotworowego, w linii komórkowej raka płuca H1299 była związana z istotnym spadkiem poziomu ekspresji genu *HMGA1*, poziomów miR22-3p i -5p, jak również z towarzyszącym temu wzrostem ilości białka PPP2R2A i zmniejszeniem ilości fosforylowanej formy białka AKT (Panneerselvam i in., 2016).

Analizy *in silico* interakcji miRNA– czynniki transkrypcyjne w NSCLC wykazały obniżone poziomy miRNA o właściwościach supresorów nowotworowych (miR-29a, -16, -125, i let-7), które fizjologicznie mogą obniżyć ekspresję genu *HMGA1* (Barh i in., 2013). Dowiedziano także, że gen *HMGA1* pozostaje pod kontrolą miR-4458. Za pomocą danych o ekspresji genów w gruczolakoraku płuca i narzędzi bioinformatycznych *HMGA1* został wytypowany jako potencjalny gen docelowy dla miR-4458, co potwierdzono następnie w badaniach *in vitro*. MiR-4458 hamowało migrację i proces EMT poprzez zmniejszenie ekspresji genu *HMGA1*. Wyciszenie *in vitro* genu *HMGA1* powodowało zmiany w ekspresji białek markerowych dla EMT: E-kadheryny, N-kadheryny, Snail. Ponieważ miR-4458 jest zaangażowane we wspomniane procesy poprzez ścieżkę PI3K/AKT, dostarczyło to również kolejnego, pośredniego dowodu, że białko HMGA1 jest ważnym elementem tego szlaku sygnalizacji w raku płuca (Ma i in., 2019). Analogicznych obserwacji dokonano dla miR-26a w linii H1299, gdzie łączyło się ono bezpośrednio z promotorem genu *HMGA1* i obniżało ekspresję tego genu na poziomie mRNA. W konsekwencji następowało osłabienie migracji, inwazyjności i wzrostu komórek nowotworowych. Poziomy ekspresji genu *HMGA1* i miR-26a korelowały negatywnie w 26 różnych liniach ludzkiego gruczolakoraka płuca (Sekimoto i in., 2017).

Poszukuje się genów docelowych dla białka HMGA1, poprzez które mogłoby ono wywierać swój onkogenny wpływ na komórki. Wykazano, że gen *HMGA1* może spełniać rolę onkogenu kierującego transformacją prawidłowych komórek płuc do fenotypu nowotworowego. Stwierdzono, że w procesie tym następuje zależna od HMGA1 nadekspresja genu *MMP-2* (ang. *matrix metalloproteinase-2*). Zwiększa ona także zdolność do migracji i inwazyjność komórek niezróżnicowanego raka wielkokomórkowego płuca (linia H1299). Co ciekawe, białko HMGA1 wiąże się bezpośrednio do promotora *MMP-2 in vivo* w liniach raka wielkokomórkowego, ale nie w komórkach linii raka płaskonabłonkowego. Zahamowanie zaś ekspresji genu *HMGA1* blokuje niezależny od macierzy zewnątrzkomórkowej wzrost komórek tego nowotworu (Hillion i in., 2009). Lin i Peng (2016) wykazali dodatnią korelację ekspresji białek HMGA1 i SIRT1 w NSCLC – zasugerowali ich możliwe współdziałanie w procesie nowotworzenia poprzez wpływ na transkrypcję zależną od TP53.

Białko HMGA1 może się także przyczyniać do zmniejszenia efektywności terapii raka płuca zarówno za pomocą leków konwencjonalnych, jak i terapii celowanych. Udowodniono, że białko to może współuczestniczyć w tworzeniu oporności na cisplatinę w NSCLC. Wykazano, że aktywacja ścieżki regulacji transkrypcyjnej FOXM1/HMGA1/G6PD (ang. *forkhead box protein M1-high mobility group AT-hook 1-G6PD*) przez transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGFβ1, ang. *transforming growth factor beta 1*) zwiększa ekspresję dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD), kluczowego enzymu cyklu pentozofosforanowego. Jednocześnie białko HMGA1 zwrótnie nasila ekspresję TGFβ1, co sugeruje istnienie pozytywnego sprzężenia zwrotnego w osi regulatorowej TGFβ1/FOXM1/HMGA1/TGFβ1. Utrzymuje ono wysoką ekspresję G6PD, przyczyniając się do oporności na cisplatinę (Rongwei Zhang i in., 2019). Istnieją także dowody, że podwyższony poziom fosforylacji HMGA1 przyczynia się do oporności na gefitinib poprzez wpływ na sygnalizację w ścieżce zależnej od EGFR. Wyciszenie ekspresji *HMGA1* w ludzkich komórkach gruczolakoraka płuca wzmacnia efektywność gefitinibu poprzez reaktywowanie sygnalizacji od EGFR lub płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*) (Wang i in., 2017).

Blokowanie funkcji białka HMGA1 mogłoby mieć zastosowanie terapeutyczne. Zablockowanie ekspresji genu *HMGA1* za pomocą adenowirusa zawierającego sekwencję tego genu w orientacji

odwrotnej w liniach komórek raka płuca A549 i H1355 spowodowało osłabienie ich proliferacji, ale nie wpłynęło na wzrost komórek prawidłowych, co dowodzi specyficzności i niskiej toksyczności działania tego antysensu (Scala i in., 2000). Wyciszenie genu *HMGA1* za pomocą siRNA w połączeniu z IL-24 powodowało istotny spadek ekspresji AKT i istotnie osłabiało migrację i inwazyjność hodowanych komórek raka płuca. Sugeruje to, że terapia złożona z IL-24 i inhibitora *HMGA1* mogłaby być efektywna w terapii tego nowotworu (Panneerselvam i in., 2016).

Obserwowana nadekspresja genu *HMGA1* i białka HMGA1 w tkankach raka płuca, jak również ich potencjalne zaangażowanie w szlaki sygnałowe kluczowe w rozwoju tego nowotworu uzasadniły poszukiwanie prognostycznego znaczenia tego białka i kodującego go genu. Wyniki badań dotyczące tego zagadnienia opublikowali jako pierwsi Sarhadi i wsp. (2006), którzy wykazali zależność obecności białka HMGA1 w jądrach komórek gruczolakoraka płuca i krótszego czasu przeżycia chorych, choć obecność ta nie wykazywała związku z indeksem proliferacji lub indeksem apoptotycznym komórek nowotworowych. Wysoka ekspresja genu *HMGA1* była związana z krótszym czasem przeżycia chorych z NSCLC także według danych zawartych w bazie Kaplan-Meier Plotter (Ma i in., 2019).

Zhang i wsp. (2015b) w badaniu obejmującym 145 pacjentów z NSCLC wykazali, że wysoka ekspresja białka HMGA1 w tkance nowotworowej była związana z wielkością guza nowotworowego, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych oraz z wyższym zaawansowaniem wg klasyfikacji TNM, jak również niskim zróżnicowaniem histologicznym tkanki nowotworowej. W analizie wieloczynnikowej wysoka ekspresja białka HMGA1 okazała się być niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym i łączyła się z krótszym czasem przeżycia chorych. Uzyskane wyniki sugerują, że białko HMGA1 może istotnie wpływać na proliferację, inwazyjność i zdolność do przerzutowania komórek NSCLC.

W innym retrospektywnym badaniu w grupie 205 pacjentów z NSCLC udowodniono, że zwiększona ilość białka HMGA1 w tkance nowotworowej, stwierdzana za pomocą techniki immunohistochemicznej, wiązała się z krótszym całkowitym czasem przeżycia chorych w porównaniu z pacjentami o małej ilości HMGA1. Jednak wpływ badanego białka na progresję NSCLC jest prawdopodobnie zależny od innych czynników. We wspomnianym badaniu wykazano, że ilość białka HMGA1 w tkance nowotworowej koreluje z ilością FOXM1 i G6PD, z którymi to HMGA1 tworzy wspólną ścieżkę regulacji transkrypcyjnej i które w ten sam sposób wiązały się z TNM i całkowitym czasem przeżycia pacjentów (Zhang i in., 2019).

Nie wszystkie dotychczasowe badania potwierdziły jednak związek ilości białka HMGA1 w tkance nowotworowej z czasem przeżycia pacjentów z rakiem płuca. Takiej zależności nie zanotowali Lin i Peng (2016), mimo że w przeprowadzonym przez nich badaniu obecność białka HMGA1 w próbach tkanek NSCLC wiązała się z niskim zróżnicowaniem histologicznym nowotworu. Badane białko było także wykrywane częściej u mężczyzn i w podtypie raka płaskonabłonkowego w porównaniu z gruczolakorakiem. Poprzez wykorzystanie profilu ekspresji mikroRNA, analizy *in silico* opartej na odwrotnej transkryptomice (ang. *reverse-transcriptomics*) oraz analizie interaktomu. Barh i wsp. (2013) wytypowali siedem czynników transkrypcyjnych, które mogłyby stanowić biomarkery w diagnostyce raka płuca. Jednym z nich był gen *HMGA1*, którego istotną nadekspresję wykazali zarówno w tkance nowotworowej, jak i we krwi pacjentów z NSCLC. Gen *HMGA1* należał też do panelu wytypowanych genów czynników transkrypcyjnych, których ekspresja oceniona w NSCLC pozwoliła na różnicowanie raka drobnokomórkowego i niedrobnokomórkowego.

Łączna analiza danych dotyczących metylacji wysp CpG i danych pochodzących z sekwencjonowania całego transkryptomu w gruczolakoraku płuca wyłoniła dziesięć genów o zmienionym poziomie ekspresji i statusie metylacji, które były istotnie związane z przeżywalnością chorych (He i in., 2018). Do grupy tych genów zaliczony został *HMGA1*, który wykazywał jednocześnie hypometylację i nadekspresję, co dowodzi istotnego wpływu mechanizmów epigenetycznych w regulacji ekspresji *HMGA1* na proces rozwoju gruczolakoraka płuca.

3. Gen *HMGA2* i białko *HMGA2*

Badania na myszach knock-out *Hmga2*/*Hmga2*- dowiodły, że gen *Hmga2* ulega ekspresji podczas rozwoju embrionalnego płuca w tkankach dolnych dróg oddechowych, gdzie jest niezbędny do prawidłowej proliferacji oraz różnicowania komórek nabłonkowych. Knock-out *Hmga2* prowadził do nasilonej sygnalizacji w ścieżce WNT poprzez zwiększenie ilości glikoprotein Wnt2b, Wnt7b i Wnt11 i jednocześnie zmniejszenie ilości białek o działaniu antagonistycznym do ścieżki WNT: Gata6 (ang. *GATA-binding protein 6*) i Fzd2 (ang. *frizzled homolog 2*). Potwierdzono, że białko *Hmga2* bezpośrednio nasila ekspresję genu *Gata6*, a ten następnie zwiększa ekspresję genu *Fzd2* (Singh i in., 2014).

We wczesnych doświadczeniach opartych na technikach hemi-nested RT-PCR i Southern-blot nie wykryto u człowieka ekspresji genu *HMGA2* w prawidłowej tkance płuca ani tkance opłucnej (Barh i in., 2013). Dalsze badania dowiodły jednak, że białko *HMGA2* jest wykrywalne (w rosnącej ilości) w prawidłowym nabłonku oskrzelowym, zmianach o charakterze metaplastacji i zmianach dysplastycznych (Sarhadi i in., 2006). Również ekspresja genu *HMGA2* była stwierdzana techniką qRT-PCR w prawidłowej tkance płuca osób zdrowych i chorych z NSCLC (Gao i in., 2017; Meyer i in., 2007).

Wszystkie dotychczasowe badania wskazują, że obecność ekspresji genu *HMGA2* jest zjawiskiem powszechnym w nowotworach płuca i że ekspresja ta jest istotnie wyższa w tkance nowotworowej niż w przylegającej tkance prawidłowej. Takie wyniki uzyskali Gao i wsp. (2017) na skutek analizy danych w bazie *Oncomine* dotyczących ekspresji genów w gruczolakoraku płuca w sześciu różnych grupach pacjentów, co potwierdzili także w badaniu własnym. Ekspresję genu *HMGA2* w badaniu qRT-PCR stwierdzono w nowotworach płuca o różnym typie histologicznym: raku płaskonabłonkowym, gruczolakoraku, raku wielkokomórkowym i raku wielopostaciowym. Była ona wyższa w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową tkanką płuca. Ekspresja genu *HMGA2* korelowała także z jądrową ekspresją białka *HMGA2* wykrywanego za pomocą techniki immunohistochemicznej (Di Cello i in., 2008; Eide i in., 2016; C. Jiang i in., 2018; Meyer i in., 2007; Sarhadi i in., 2006; Sun i in., 2017; Xu i in., 2016). Stwierdzono także współzależność ilości białek *HMGA1* i *2* (Sarhadi i in., 2006).

Doświadczenia *in vitro* wykazały, że białko *HMGA2* jest czynnikiem niezbędnym do zainicjowania procesu nowotworzenia w płucach. Indukowana nadekspresja genu *HMGA2* prowadziła do uzyskania fenotypu nowotworowego przez komórki prawidłowego nabłonka oskrzelowego (BEAS-2B), tj. zdolności wzrostu niezależnego od zakotwiczenia (ang. *anchorage-independent growth*) i tworzenia kolonii komórkowych. Z drugiej strony zahamowanie ekspresji genu *HMGA2* z wykorzystaniem interferencji RNA zmniejszało ilość białka *HMGA2* i blokowało niezależny od zakotwiczenia wzrost komórek ludzkiego raka niedrobnokomórkowego płuca H1299 (Di Cello i in., 2008).

HMGA2 może nie tylko inicjować proces transformacji nowotworowej, ale także odpowiada za progresję nowotworu. Di Cello i wsp. (2008) wykazali, że ekspresja genu *HMGA2* nie była podwyższona w wolno rosnących rakowiakach płuca w stosunku do tkanki prawidłowej. Obniżenie ekspresji *HMGA2* w większości przypadków rakowiaków płuca w stosunku do prawidłowej tkanki płuca stwierdzili natomiast Di Fazio i wsp. (2017). Knock-down *HMGA2* w komórkach linii H1299 o silnej endogennej ekspresji tego genu prowadził do zmniejszenia zdolności proliferacyjnych, ruchliwości i inwazyjności komórek. Natomiast komórki linii A549 o słabej endogennej ekspresji genu *HMGA2*, transfekowane *HMGA2*, wskazywały zwiększoną proliferację, zdolność do migracji i inwazyjność (Gao i in., 2017). Jądrowa ekspresja białka HMGA2 korelowała pozytywnie z indeksem proliferacyjnym komórek raka płuca wyrażonym ilością markera Ki-67 w badaniu techniką immunohistochemiczną (Sarhadi i in., 2006). Zbieżne wyniki do powyżej przedstawionych uzyskali także Naghizadeh i wsp. (2019) oraz Sun i wsp. (2017), którzy po zablokowaniu *HMGA2* za pomocą specyficznego siRNA obserwowali osłabienie żywotności, zdolności do migracji i inwazyjność komórek linii A549 i/lub H460.

W czasie progresji nowotworu obserwuje się proces EMT, podczas którego zachodzą zmiany morfologiczne w komórkach. Następuje modyfikacja fenotypu nabłonkowego na mezenchymalny, osłabienie powiązań międzykomórkowych, nasilenie oddziaływań komórka-macierz zewnątrzkomórkowa i oddzielanie się komórek od błony podstawnej z towarzyszącymi im charakterystycznymi zmianami molekularnymi, obejmującymi m.in. EGF, PDGF, TGF β , WNT/ β -katenina oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (Gos i in., 2009). Wyciszenie genu *HMGA2* w linii H1299 prowadziło do zwiększenia ilości białek związanych z procesem EMT: E-kadheryny oraz zmniejszenia ilości wimentyny i Twist1, bezpośredniego represora E-kadheryny, a transdukcja *HMGA2* w linii A549 dawała przeciwne efekty (Gao i in., 2018). W analogicznym doświadczeniu przeprowadzonym przez Naghizadeh i wsp. (2019) transfekcja siRNA specyficznym dla *HMGA2* komórek linii A549 powodowała nie tylko zależne do dawki obniżenie ekspresji tego genu, ale także zmniejszenie ekspresji genów związanych z EMT: *MMP1* (ang. *matrix metalloproteinase 1*), *CXCR4* (ang. *C-X-C chemokine receptor type 4*), *VIM* (ang. *vimentine*). Udowodniono, że wpływ białka HMGA2 na proces EMT podlega regulacji przez białko PP4R1 (ang. *protein phosphatase 4 regulatory subunit 1*). Wykazano, że PP4R1 nasila ekspresję genu *HMGA2* i zwiększa ilość kodowanego przez niego białka w komórkach raka płuca *in vitro*. Powoduje to aktywację ścieżki sygnalizacji MAPK/ERK, a w konsekwencji zwiększenie ilości N-kadheryny, β -kateniny i wimentyny oraz zmniejszenie ilości E-kadheryny (Wang i in., 2020a). Ekspresja genu *HMGA2* ulega również nasileniu pod wpływem działania angiogeniny (ANG), rybonukleazy z nadrodziny RNaz A. Indukowana ekspresja genu *ANG* przy użyciu wektorów adenowirusowych w linii komórkowej płaskonabłonkowego raka płuca (SK-MES-1) powodowała nasilenie ekspresji genów *MMP-2*, *HMGA2*, *NFKB* i *BCL2*. Przy użyciu immunoprecypitacji chromatyny i testu lucyferazowego wykazano, że białko ANG wiąże się bezpośrednio do promotora genu *HMGA2*, co powoduje nasilenie inwazyjności i zdolności do migracji komórek SK-MES-1 (Xu i in., 2016). Szereg doświadczeń *in vitro* przeprowadzonych na komórkach NSCLC dowiódł, że onkogenne białko transbłonowe MUC1-C aktywuje wraz z NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) transkrypcję genu *LIN28B*. Prowadzi to do zmniejszenia ekspresji mikroRNA *let-7* i zwiększenia ekspresji genu *HMGA2*, a to promuje EMT i nasila zdolność do samoodnowy komórek raka płuca (Alam i in., 2015).

Dla wzrostu komórek nowotworowych kluczowy jest balans między podziałami a apoptozą. Tworzenie kolonii komórkowych przez komórki *in vitro* jest wypadkową nasilenia mitozy i apoptozy. Istnieją dowody, że białko HMGA2 może regulować wzrost nowotworu także poprzez wpływ na proces apoptozy. Wyciszenie genu *HMGA2* w linii komórkowej H1299 powodowało zmniejszenie ilości anty-apoptotycznego białka BCL2 i nasilenie aktywności kaspaz 3 i 9, natomiast transfekcja *HMGA2* dawała przeciwny efekt (Gao i in., 2017).

Dowodzono, że ekspresja genu *HMGA2* w komórkach raka płuca jest regulowana przez mikroRNA. Zastosowanie narzędzi bioinformatycznych (TargetScan, miRDB, microRNA.org, miRanda, PicTar, RNA22) pozwoliło na wytypowanie kilku mikroRNA, które posiadają komplementarne sekwencje w obrębie regionu 3' nieulegającego translacji (ang. *3' untranslated region*, 3'UTR) mRNA *HMGA2*: miR-33a (Rice i in., 2013), miR-195 (Gao i in., 2017), miR-219 (Sun i in., 2017), miR-363-3p (Jiang i in., 2018a), miR-495 (Sun i in., 2019), miR-498 (Gao i in., 2018), miR-541 (Xu i in., 2018). Bezpośrednie oddziaływanie z *HMGA2* potwierdzono *in vitro* w systemie lucyferazowym w przypadku miR-195, miR-219, miR-363-3p, miR-495, miR-498 i miR-541. Ekspresja genu *HMGA2* korelowała negatywnie z ekspresją miR-219 (Sun i in., 2017) i miR-363-3p (Jiang i in., 2018a) w tkance NSCLC.

Proces nowotworzenia w tkance płuca przebiega z obniżeniem mikroRNA regulujących ekspresję genu *HMGA2*. Stwierdzono, że ekspresja mikroRNA-219, -363-3p, -495, -498, -541 była obniżona w tkance NSCLC w porównaniu z tkanką otaczającą, jak również w komórkach linii wyprowadzonych z tego nowotworu (A549, H460, H1650, H520, SK-MES-1, H23, H522, SPC-A1, H1299, 95D, H226, H1299) w porównaniu z komórkami normalnego nabłonka oskrzelowego. *In vitro* każde ze wspomnianych mikroRNA miało zdolność osłabiania przynajmniej jednej z wymienionych cech komórek raka płuca: potencjału proliferacyjnego, inwazyjności, zdolności do migracji. Dodatkowo miR-498 nasilało zdolność do apoptozy. W przypadku miR-495, -489, i -541 udowodniono, że nadekspresja genu *HMGA2* znosi opisany hamujący wpływ tych mikroRNA. Przeciwnie, wyciszenie genu *HMGA2* w komórkach H522 i A459 dawało taki sam efekt jak nadekspresja miR-363-3p – zmniejszała proliferację i inwazyjność komórek (Gao i in., 2018; Jiang i in., 2018a; Sun i in., 2019; Sun i in., 2017; Xu i in., 2018).

MikroRNA, jako post-transkrypcyjne regulatory syntezy białek, mogą regulować proces translacji bądź wpływać na stabilność mRNA. Wykazano, że nadekspresja miR-195 zmniejszała ekspresję *HMGA2* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w komórkach linii H1299 (Gao i in., 2017). Analogiczne wyniki uzyskano w badaniu oddziaływania miR-541 w liniach SK-MES-1 i H226 (Xu i in., 2018) i miR-495 w linii A549 (Sun i in., 2019). Możliwe jednak, że sposób regulacji jest zależny od rodzaju mikroRNA, zaobserwowano bowiem, że nadekspresja miR-219 w liniach A549 i H460 redukowała poziom białka *HMGA2*, ale nie zmieniała poziomu mRNA *HMGA2* (Sun i in., 2017). Hamowanie procesu translacji *HMGA2* w komórkach raka płuca A549 następuje również pod wpływem *pre-let-7g*, prekursorowej cząsteczki mikroRNA *let-7g* (Park i in., 2010). Należy ona do rodziny mikroRNA *let-7*, dla których w 3'UTR ludzkiego genu *HMGA2* znaleziono siedem miejsc komplementarnych. Opisano chromosomowe translokacje w nowotworach, które prowadzą do produkcji skróconego mRNA *HMGA2*, nieposiadającego tych miejsc komplementarnych. Prowadzą one do zniesienia represji *HMGA2* przez *let-7*, co promuje niezależny do zakotwiczenia wzrost komórek, charakterystyczny dla transformacji nowotworowej (Mayr i in., 2007). W atypowych rakowiakach płuca ekspresja genu *HMGA2* korelowała negatywnie z ekspresją *hsa-let-7f-5p*

mikroRNA, dla którego *HMGA2* jest przewidywanym genem docelowym (Di Fazio i in., 2017). Wykazano, że ektopowa ekspresja *let-7* w komórkach linii raka płuca H1299 zmniejsza ilość mRNA *HMGA2* i białka *HMGA2* oraz zdolność do proliferacji tych komórek. To działanie *let-7* polega na destabilizacji mRNA w cytoplazmie. W komórkach H1299, gdzie uzyskano stabilną ekspresję genu *HMGA2* posiadającego otwartą ramkę odczytu, ale bez 3'UTR, transfekcja *let-7* nie spowodowała zmniejszenia ekspresji skróconego mRNA *HMGA2*, ale zmniejszyła ekspresję mRNA *HMGA2* o pełnej długości. Nadekspresja *HMGA2* bez regionu 3'UTR pozwala na zniesienie hamującego wpływu *let-7* na proliferację komórek. Jest to dowodem na to, że w nowotworach płuca może dochodzić do aktywacji onkogenów poprzez translokacje eliminujące 3'UTR, które zawierają miejsce docelowe dla *let-7* (Yong i Dutta, 2007).

Prawdopodobnie związek regulacyjny mikroRNA i genu *HMGA2* jest częścią większej sieci sygnałowej w komórkach raka płuca. W tkankach guza pobranych od pacjentów z NSCLC Eide i wsp. (2016) stwierdzili koekspresję genów *HMGA2*, *MYCN* i *DICER1*. Poziom ekspresji genu *HMGA2* był związany także z poziomami ekspresji kilku mikroRNA z rodziny *let-7*: *-7a*, *-7c*, *-7d*, *-7f*, *-7g*. Badacze zasugerowali istnienie ścieżki regulacyjnej MYCN-LIN28B-LET7-HMGA2-CDKN2 w NSCLC. *Pre-let-7g* posiada zdolność obniżania ekspresji genu *HMGA2*, co powoduje następnie zmniejszenie ilości czynnika transkrypcyjnego E2F1 w jądrach komórek raka płuca linii A549 i ich zdolności do migracji. Dodatkowo wykazano, że wyciszenie genu *HMGA2* w komórkach A549 wiąże się ze zmniejszeniem ilości białka KRAS, innego celu komórkowego *pre-let-7g*. Ponieważ jednoczesne wyciszenie genów *HMGA2* i *KRAS* daje silniejsze zahamowanie migracji komórek w porównaniu z wyciszeniem tych genów pojedynczo, badacze sugerują, że KRAS jest białkiem podległym *HMGA2* we wspólnym szlak sygnalizacji (Park i in., 2010). Doświadczenia przeprowadzone przez Dai i wsp. (2019) dowiodły, że możliwe jest współdziałanie między genami *HMGA2*, *GSKIP* (ang. *glikogen synthase kinase 3 beta interacting protein*) i genem β -kateniny w komórkach NSCLC. W 3'UTR wszystkich tych genów występują miejsca docelowe dla miR-150-5p, które powoduje obniżenie ich ekspresji. W komórkach H1299 jednoczesna ekspresja genów *HMGA2* i genu kodującego β -kateninę bardziej kompletnie znosiła hamujące działanie miR-150-5p na proliferację i inwazyjność komórek niż nadekspresja jednego z tych genów. Dodatkowo skrócenie czasu przeżycia pacjentów z NSCLC było tym większe, im większa liczba spośród tych trzech genów wykazywała nadekspresję w komórkach nowotworowych.

Podobnie jak dla genu *HMGA1* i kodowanego przez niego białka, również w przypadku genu *HMGA2* poszukuje się związku między poziomem jego ekspresji a cechami kliniczno-patologicznymi w grupach chorych z rakiem płuca. Meyer i wsp. (2007) nie stwierdzili zależności między poziomem ekspresji genu *HMGA2* w tkance nowotworowej a typem histologicznym, stopniem zaawansowania wg klasyfikacji TNM czy stopniem złośliwości. Jednakże badanie to przeprowadzono na niewielkiej liczbie przypadków. Inne badania na większych grupach wykazały, że poziom ekspresji genu *HMGA2* i/lub ilość białka *HMGA2* są wyższe w raku płaskonabłonkowym niż gruczolakoraku (Eide i in., 2016; Sarhadi i in., 2006), a ilość białka *HMGA2* w tkance nowotworowej koreluje pozytywnie ze stopniem złośliwości histologicznej nowotworu (Di Cello i in., 2008).

Poprzez analizę danych zgromadzonych w bazie *Oncomine* Gao i wsp. (2017) stwierdzili, że wysoka ekspresja genu *HMGA2* w tkance nowotworowej była związana z krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjentów w pięciu różnych grupach chorych z gruczolakorakiem płuca. Badacze potwierdzili wynik analizy w badaniu własnym. Również Sarhadi i wsp. (2006) stwierdzili zależność

między wysoką ekspresją białka HMGA2 w tkance nowotworowej a krótszym czasem przeżycia pacjentów z gruczolakorakiem płuca. Takiego związku nie zanotowano natomiast dla innych podtypów histologicznych raka płuca. Związek *HMGA2* z prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów może być zależny od obecności innych czynników. Badania Eide i wsp. (2016) nie potwierdziły, aby poziom ekspresji *HMGA2* w tkankach NSCLC był niezależnym czynnikiem prognostycznym w jednoczynnikowym modelu Coxa. Wykazały natomiast, że jednoczesne występowanie niskiej ekspresji genów *HMGA2* i *MYCN* w tkance NSCLC wiązało się z dłuższym czasem przeżycia pacjentów z NSCLC niż występowanie niskiej ekspresji tylko jednego z tych genów.

4. Gen *HMGB1* i białko HMGB1

Wysoka ekspresja *HMGB1* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka była stwierdzana w różnych liniach komórkowych NSCLC (A549, SPC-1-1, NCI-2170, SK-MES-1, NCI-H1299) i była istotnie wyższa niż w komórkach ludzkich fibroblastów płodowych WI-38 (Zhang i in., 2015a). W komórkach A549 transfekcja genu *HMGB1* powodowała wzrost ilości białka *HMGB1* zarówno w jądrze komórkowym, cytoplazmie, jak i przestrzeni międzykomórkowej (Liu i in., 2017).

Dotychczas przeprowadzono liczne badania dotyczące występowania i znaczenia ekspresji genu *HMGB1* i kodowanego przez niego białka w tkankach raka płuca. Wyniki większości z nich zostały zebrane i łącznie opracowane w dwóch metaanalizach przez Feng i in. (2016) i Xia i in. (2016). Według obu tych analiz, uwzględniających wyniki oznaczeń metodami ELISA, Western-blot i techniką immunohistochemiczną, ilość białka *HMGB1* w tkance nowotworowej była istotnie wyższa niż w tkance przylegającej niezmięnionej nowotworowo, jak i prawidłowej tkance płuca pobranej od osób bez nowotworu. Również ekspresja genu *HMGB1* oznaczana metodą qRT-PCR była istotnie wyższa w tkance nowotworowej w porównaniu z prawidłową tkanką płuca.

Badania wykazały także, że stężenie białka *HMGB1* w surowicy chorych z NSCLC było istotnie wyższe niż w surowicy osób zdrowych (Feng i in., 2016; Xia i in., 2016). Wyższe surowicze stężenie białka *HMGB1* u osób z zaawansowanym NSCLC w porównaniu z osobami zdrowymi stwierdzili także Naumnik i wsp. (2009). Stężenie białka *HMGB1* w surowicy pacjentów z NSCLC było istotnie wyższe niż w surowicy pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (Shang i in., 2009), jak i pacjentów z sarkoidozą oraz pozytywnie korelowało z poziomem białka *HMGB1* w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych (Jakubowska i in., 2015). Źródłem zwiększonych stężeń białka *HMGB1* w surowicy są najprawdopodobniej komórki nowotworowe. Myszy, którym podano komórki linii A459 z wyciszonym genem *HMGB1*, posiadały mniejsze surowicze stężenie białka *HMGB1* niż myszy, którym wszczepiono te same komórki niepoddane wyciszaniu (Zheng i in., 2016). Zwiększone stężenie białka *HMGB1* wykryto także w płynie z jamy opłucnowej chorych z NSCLC w porównaniu ze stężeniem tego białka w płynie pobranym od osób z chorobami nienowotworowymi (Ma i in., 2018).

Ekspresja genu *HMGB1* oraz funkcja białka *HMGB1*, jak również skłonność do niektórych schorzeń u poszczególnych osób są uwarunkowane polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*). Z tego względu poszukiwano zależności między wybranymi SNP genu *HMGB1* a ryzykiem rozwoju raka płuca. Dotychczasowe nieliczne badania w tym zakresie zostały przeprowadzone w chińskiej populacji Han. Stwierdzono, że zarówno heterozygoty CT, jak i osoby posiadające co najmniej jeden allel T dla polimorfizmu rs1045411 (2262C/T) genu *HMGB1* wykazują zmniejszone ryzyko raka płuca o około 40% w porównaniu z homozygotami CC. Polimorfizm ten jest położony w regionie 3' przylegającym do genu *HMGB1* i może wpływać na

20

poziom jego ekspresji. Analiza danych w bazie Genotype-Tissue Expression Project wykazała istnienie tendencji do zmniejszonego poziomu ekspresji genu *HMGB1* u osób posiadających co najmniej jeden allel T dla rs1045411 w porównaniu z homozygotami CC. Ponadto obecność haplotypu G/T/C złożonego z trzech SNPów *HMGB1* (rs1360485/rs1045411/rs2249825) wiązała się ze zmniejszonym niemal o połowę ryzykiem rozwoju raka względem najczęściej występującego w badanej populacji haplotypu A/C/C. W badaniu tym nie wykazano natomiast związku polimorfizmów SNP rs2249825 (3814C/G), rs1412125 (-1615T/C) i rs1360485 (3'UTR, T/C) z ryzykiem rozwoju raka płuca (Hu i in., 2017).

Przeciwnie wyniki uzyskano w innym badaniu dotyczącym SNPów rs1412125 i rs1360485 w populacji Han, lecz zamieszkującej inny region Chin. Stwierdzono, że u osób posiadających co najmniej jeden allel C dla polimorfizmu rs1412125 wykazano zmniejszone ryzyko raka płuca o około jedną czwartą w porównaniu z homozygotami TT. Podobne wyniki uzyskano także w podgrupie osób niepalących i wśród kobiet, natomiast polimorfizm ten nie wpływał na ryzyko raka płuca ani wśród palaczy, ani wśród mężczyzn. Polimorfizm rs1360485 położony jest w regionie nieulegającym translacji, więc nie zmienia sekwencji białka HMGB1, może natomiast regulować proces transkrypcji genu *HMGB1* bądź innych genów. Allel G rs1360485 wiązał się ze zmniejszeniem ryzyka raka płuca o 17% w odniesieniu do allela A, a genotypy AG i GG ze zmniejszeniem ryzyka o 21% raka płuca wśród kobiet (Jiang i in., 2018c).

W patogenezie raka płuca istotną rolę odgrywają mutacje genu *EGFR*, które mogą prowadzić do stałej aktywacji kodowanego przez ten gen receptora, a w konsekwencji do nasilenia proliferacji i przeżywalności komórek. Dowiedziono, że istnieje genetycznie uwarunkowana skłonność do powstawania tych mutacji. Ponieważ białko HMGB1 uczestniczy w naprawie uszkodzeń DNA powstałych pod wpływem kancerogenów zawartych w dymie papierosowym lub stosowanych chemioterapeutykach, poszukiwano związku między polimorfizmami rs1412125, rs2249825, rs1045411 i rs1360485 *HMGB1* a skłonnością do mutacji *EGFR* u pacjentów z gruczolakorakiem płuca w populacji Tajwanu. W tej grupie osoby palące będące heterozygotami CG rs2249825, CT rs1045411 lub TC rs1360485 wykazywały zmniejszone ryzyko powstania mutacji w genie *EGFR* (odpowiednio o 93%, 88% i 88%) w porównaniu z homozygotami dzikimi dla tych polimorfizmów. SNP rs1360485 nie wiązał się ze zmianą ryzyka powstania mutacji *EGFR*. Dodatkowo stwierdzono negatywną zależność między obecnością genotypu CG oraz obecnością co najmniej jednego allela C (genotypy CG + CC) dla polimorfizmu rs2249825 a obecnością delekcji eksonu 19 *EGFR* (Wu i in., 2019).

Podobnie jak wcześniej opisane białka z rodziny HMGA, również HMGB1 bierze udział w procesie nowotworzenia, wpływając na takie procesy jak cykl komórkowy i proliferacja, inwazja i migracja czy apoptoza. Białko to wywiera jednak swoje onkogenne działanie nie tylko wewnątrz komórek podlegających transformacji, lecz także po uwolnieniu z komórek nekrotycznych. Dotychczasowe wyniki badań dowodzą, że kluczowym i integrującym dla udziału HMGB1 w różnych procesach komórkowych jest czynnik NF- κ B. Wykazano, że nadekspresja miR-449a zmniejsza ilość białka HMGB1 i zapobiega fosforylacji P65 (pNF- κ B) w komórkach A549. Wyindukowana nadekspresja genu *HMGB1* jest w stanie częściowo przywrócić ekspresję białka P65 (Wu i in., 2019a).

Udowodniono, że wyciszenie genu *HMGB1* za pomocą siRNA w komórkach A549 i H1299 powoduje zahamowanie migracji i inwazyjności komórek (Zhang i in., 2013). HMGB1 promuje inwazję i przerzutowanie komórek raka płuca poprzez zwiększanie ekspresji białka MMP-2,

a działanie to wywiera poprzez sygnalizację zależną od NF- κ B. Ilość białka MMP-2 była podwyższona w komórkach A549 i H1299 pod wpływem podawania białka HMGB1, jednak efekt ten był znacznie osłabiony poprzez blokowanie za pomocą siRNA genu *P65* kodującego podjednostkę NF- κ B (Wu i in., 2018c). W innym badaniu stwierdzono, że ekspresja genu *MMP-9* (ale nie *MMP-2*) oraz zdolność do przerzutowania i inwazji były wyższe w komórkach raka płuca A549 i H23, gdzie wyindukowano nadekspresję genu *HMGB1*, lecz efekt ten był znacznie osłabiony poprzez zastosowanie selektywnych inhibitorów PI3K/AKT i NF- κ B. Natomiast wyciszenie genu *HMGB1* w komórkach A549 i H23 za pomocą siRNA wywołało przeciwny efekt – spadek ekspresji genu *MMP-9* i osłabienie przerzutowania tych komórek. Dodatkowo stwierdzono korelację pomiędzy poziomami ekspresji genów *HMGB1* i *MMP-9* w tkance NSCLC (Liu i in., 2010). HMGB1 indukuje migrację komórek NSCLC także poprzez nasilenie ekspresji integryny $\alpha\beta 3$, co prowadzi dalej do fosforylacji białka FAK (ang. *focal adhesion kinase*) i nasila ekspresję genów kodujących paksilinę i talinę, jak również aktywuje białka TLR4 (ang. *toll-like receptor 4*) i NF- κ B (Zhu i in., 2016).

Interesujące dane dotyczące zaangażowania HMGB1 w procesy proliferacji, inwazji i migracji komórek przyniosły doświadczenia z zastosowaniem pirogronianu etylu, inhibitora białka HMGB1, który hamuje jego wydzielanie poza komórkę. Stwierdzono, że związek ten hamuje proliferację, inwazję i migrację komórek NSCLC oraz indukuje ich apoptozę. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że powodował on też zależnie od dawki zmniejszenie ekspresji HMGB1 i jego receptora RAGE zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, hamując tym samym ścieżkę sygnalizacji HMGB1/RAGE. Jednocześnie zmniejszał też, na poziomie mRNA, jak i białka, ekspresję PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) i MMP-9 oraz zwiększał ekspresję P53. Zmniejszał także ekspresję białek BCL-2 i MCL-1, a zwiększał ekspresję białka BAX. Wysokie stężenia pirogronianu etylu istotnie zmniejszały aktywację białek NF- κ B i STAT3 poprzez zmniejszenie ilości ich form ufosforylowanych (Liu i in., 2019). Zaangażowanie HMGB1 w proces apoptozy i migracji komórek potwierdzają także badania *in vivo*. U myszy, którym wszczepiono komórki NCI-H157 z nadekspresją miR-520a-3p, zaobserwowano zmniejszenie ekspresji genu *HMGB1* oraz ilości kodowanego przez niego białka z jednoczesnym zmniejszeniem ilości białek MMP-2 i MMP-9, obniżeniem stosunku ilości białek BCL-2/BAX, jak również zwiększeniem ilości białka kaspazy 3 (Lv i in., 2018).

HMGB1 promuje także proces EMT. W tkance NSCLC wykazano jednoczesną, zwiększoną ilość białka HMGB1 i markerów EMT: α -SMA (ang. *α -smooth muscle actin*), wimentyny, β -aktyny. Nadekspresja genu *HMGB1* w komórkach A549 powodowała wzrost, natomiast wyciszenie przez siRNA – spadek ekspresji na poziomie mRNA i białka: α -SMA, wimentyny i β -aktyny. Nadekspresja ta indukowała także reorganizację cytoszkieletu, głównie F-aktyny, która spełnia istotną rolę w procesach migracji i inwazji komórek. Wyciszenie genu *HMGB1* przez siRNA nasilało adhezję międzykomórkową, zmniejszało ilość F-aktyny oraz osłabiało migrację i inwazję komórek. Nadekspresja genu *HMGB1* wpływała na obszar kontaktu między komórkami i promowała wytwarzanie wydłużonych filopodiów o zwiększonej stabilności (wiązki równoległe położonych filamentów aktynowych i innych białek wiążących się z aktyną). Dodatkowo u myszy, którym wszczepiono podskórnie komórki ludzkiego raka płuca A549 z nadekspresją genu *HMGB1*, zaobserwowano nasilenie procesu EMT (Liu i in., 2017).

Wyciszenie przez siRNA genu *HMGB1* w hodowli komórek A459 powodowało istotne zmniejszenie ich proliferacji, żywotności i ruchliwości. Przeciwnie, ektopowa nadekspresja genu *HMGB1* w komórkach H1299 istotnie zwiększała ich żywotność i ruchliwość oraz prowadziła do

aktywacji ścieżki WNT/ β -katenina i promowała proces EMT. Wyciszenie *HMGB1* w komórkach A549 powodowało nadekspresję markera epitelialnego – białka E-kadheryny i zmniejszenie ekspresji markerów mezenchymalnych – białek *SNAI1*, *SLUG* i N-kadheryny. Ponadto wyciszenie *HMGB1* powodowało zmniejszenie ekspresji mRNA i/lub białek c-Myc, cykliny D1, β -kateniny oraz nadekspresję aksyny, *GSK3 β* i *APC*. Porównywalne wyniki uzyskano w komórkach H1299 z ektopową nadekspresją *HMGB1* i jednoczesnym podaniem inhibitora ścieżki WNT, *C59* (Wang i in., 2020b). W innym badaniu udowodniono, że *HMGB1* łączy się bezpośrednio z promotorem genu *SNAI1*, pobudzając jego ekspresję (Wu i in., 2020).

Istnieją dowody, że białko *HMGB1* reguluje procesy proliferacji i inwazji komórek raka płuca także poprzez modulację aktywacji ścieżek *ERK1/2* i *p38/MAPK*. Stwierdzono, że egzogenna ekspresja genu *HMGB1* promowała proliferację i inwazyjność komórek A549 (linia z prawidłową formą genu *EGFR*) i nasilała również ekspresję fosforylowanych form *p38* i *ERK1/2* (przy niezmięnionej ilości tych białek), a także jądrową ekspresję *NF- κ B*. Podobne wyniki uzyskano w linii *NCI-H1975*, która posiada zmutowany gen *EGFR*, co wskazuje, że ta ścieżka jest aktywowana niezależnie od sygnalizacji *EGFR* (Sun i in., 2013).

Udowodniono również, że w procesach EMT, inwazji i przerzutowania w komórkach raka płuca A549 białko *HMGB1* współdziała z białkiem *NAC1* (ang. *nucleus accumbens associated protein 1*), transkrypcyjnym białkiem inhibitorowym. *NAC1* uczestniczy także w procesie autofagii regulowanej przez białko *HMGB1*. Zaobserwowano, że transfekcja *NAC1* nasilała proliferację komórek, zmniejszała liczbę komórek w fazie G1, a zwiększała w fazie S. Zwiększała także zdolność do inwazji oraz ekspresję *HMGB1*, N-kadheryny, wimentyny, a zmniejszała ekspresję E-kadheryny zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, a zastosowanie *shNAC1* dawało przeciwne efekty (Liu i in., 2018).

Komórki ekspozowane na czynniki stresowe zewnątrz- bądź wewnątrzkomórkowe uwalniają różnorodne składniki związane ze zniszczeniem (ang. *damage-associated molecular pattern*, DAMPs). Białko *HMGB1* jest jednym z DAMPs, uwalnianych z komórek uszkodzonych i nowotworowych (Wang i in., 2019). Powoduje ono wtedy m.in. nieinfekcyjną odpowiedź zapalną i sprzyja przeżywaniu komórek poprzez łączenie się ze swoim receptorem przezbłonowym *RAGE*. Pozakomórkowo występujące białko *HMGB1* jest kluczowym koefektorem oligonukleotydów CpG w nasilaniu progresji wzrostu i inwazji komórek 95D, które rozpoznają *HMGB1* poprzez receptory *RAGE* i *TLR4*. Stwierdzono, że niemetylowane 20-merowe oligonukleotydy CpG w sposób zależny od dawki stymulowały komórki 95D ludzkiego raka płuca do wydzielania białka *HMGB1*, co nasilało progresję tych komórek. Działanie takie było znoszone w dużej mierze pod wpływem inhibitorów *HMGB1*, takich jak np. pirogronian etylu. Co więcej, białko *HMGB1* nasilało progresję komórek 95D zarówno samodzielnie, jak i synergistycznie z oligonukleotydami CpG. Dowiedzono bowiem, że *HMGB1* wiąże się z oligonukleotydami CpG, lecz dla wywierania ich synergistycznego wpływu niezbędne są receptory *RAGE* i *TLR4*. W komórkach 95D pod wpływem działania białka *HMGB1* dochodziło do wzrostu ilości białek *MMP-2*, *MMP-9* i *CDK2* (ang. *cyklin-dependent kinase 2*). To działanie *HMGB1* było zależne od cząsteczki adaptorowej dla receptora *TLR MyD88*, która wiąże się do fosforylowanego *RAGE* i powoduje przenoszenie sygnału (Wang i in., 2012).

Uwalnianie z komórek DAMPs, w tym *HMGB1*, skutkuje także stresem związanym z retikulum endoplazmatycznym (ang. *endoplasmic reticulum stress*) oraz syntezą reaktywnych form tlenu. Wykazano, że wyciszenie genu *HMGB1* w komórkach A549 za pomocą siRNA promuje apoptozę oraz powoduje produkcję reaktywnych form tlenu, co zmniejsza przeżywalność komórek

nowotworowych. Nasila także ekspresję białka BAX oraz białek markerowych dla stresu związanego z retikulum endoplazmatycznym: p-ERK, eIF2 α , GADD153 i IRE1 α (Tu i in., 2019).

W warunkach hipoksji białko HMGB1 uwalniane z komórek nekrotycznych może stymulować również neoangiogenezę poprzez aktywowanie czynników proangiogennych czy indukcję proliferacji i migracji komórek nabłonkowych (Smolarczyk i in., 2012). Wykazano, że przed leczeniem cytoredukcyjnym stężenie białka HMGB1 w surowicy pacjentów z NSCLC było pozytywnie skorelowane ze stężeniem surwiwiny (inhibitor angiogenezy), a po tym leczeniu negatywnie skorelowane ze stężeniem VEGF (czynnik proangiogeny) (Naumnik i in., 2009).

W komórkach raka płuca białko HMGB1 podlega regulacji poprzez sygnalizację JAK/STAT. Aktywacja tej ścieżki moduluje proces acetylacji białka HMGB1, towarzyszącej jego przejściu z jądra komórkowego do cytoplazmy. Glicyryzyna, związek z grupy triterpenów o działaniu przeciwzapalnym, powodowała zmniejszenie ilości białka HMGB1 w tkance nowotworowej ludzkiego raka płuca w modelu mysim. Jednocześnie stwierdzono, że pod wpływem tego związku następuje zahamowanie fosforylacji białek JAK3 i STAT3 (Wu i in., 2018b).

Podobnie jak geny z rodziny *HMGA* również gen *HMGB1* podlega negatywnej regulacji przez liczne mikroRNA. Analizy bioinformatyczne wykazały, że 3'UTR genu *HMGB1* jest bezpośrednim celem cząsteczek mikroRNA: miR-34c (Tu i in., 2019), miR-142-3p (Chen i in., 2017; Xiao i Liu, 2015), miR181-b (Liu i in., 2016), miR-200c (Liu i in., 2017), miR-218 (Zhang i in., 2013), miR-325-3p (Yao i in., 2015), miR-449a (Wu i in., 2019a). Funkcjonalne znaczenie dla regulacji ekspresji genu *HMGB1* potwierdzono *in vitro* dla miR-34c (Tu i in., 2019), miR-142-3p (Xiao i Liu, 2015), miR181-b Liu i in., 2016), miR-218 (Zhang i in., 2013), miR-325-3p (Yao i in., 2015) i miR-449a (Wu i in., 2019a). Wykazano, że ekspresja miR-142-3p, miR181-b i miR-325-3p była obniżona w tkance NSCLC w porównaniu z prawidłową tkanką płuca (Yun Liu i in., 2016; Xiao i Liu, 2015; Yao i in., 2015), a poziom ekspresji miR-325-3p korelował negatywnie z poziomem ekspresji genu *HMGB1* w tkance NSCLC (Yao i in., 2015).

Ektopowa nadekspresja *in vitro* miR-34c, miR-142-3p, miR-200c, miR-218, miR-325-3p, miR181-b i miR-449a powodowała spadek ekspresji genu *HMGB1* i/lub ilości kodowanego przez niego białka (Liu i in., 2017; Liu i in., 2016; Tu i in., 2019; Wu i in., 2019a; Xiao i Liu, 2015; Yao i in., 2015; Zhang i in., 2013). Dla wybranych mikroRNA wpływających na ekspresję genu *HMGB1* wykazano, że mają zdolność osłabiania proliferacji (miR-142-3p, -325-3p, -449a, -520a-3p), tworzenia kolonii komórkowych (miR-142-3p), inwazyjności (miR-325-3p, -181-b, -449a, -520a-3p) i migracji (miR181-b, -449a, -520a-3p), także nasilania apoptozy (miR-142-3p, -520a-3p) *in vitro* w komórkach raka płuca (Liu i in., 2016; Lv i in., 2018; Wu i in., 2019a; Xiao i Liu, 2015; Yao i in., 2015).

Oporność na chemioterapię jest jedną z przyczyn wciąż niezadowolających wyników leczenia NSCLC. Istnieją dowody, że białko HMGB1 może aktywnie uczestniczyć w odpowiedzi na chemioterapię stosowaną w leczeniu tego nowotworu. Komórki linii A459/DDP wykazujące oporność na cisplatynę posiadały większą ilość białka HMGB1 niż komórki wrażliwe na ten chemioterapeutyk (Zhang i in., 2015a; Zheng i in., 2016). Co więcej, w liniach komórkowych NSCLC A549, SPC-A-1, SK-MES-1 po podaniu adriamycyny, cisplatyny bądź metotreksatu zaobserwowano wzrost zarówno poziomu ekspresji genu *HMGB1*, jak i ilości białka HMGB1 (Zhang i in., 2015a; Zheng i in., 2016). Dowiedziono, że zastosowanie HMGB1 nie ma wpływu ani na żywotność, ani na tworzenie kolonii przez komórki A549. Jednak podanie tego białka do komórek wraz z cisplatyną

powoduje osłabienie jej działania – redukuje negatywny wpływ cisplatyny na żywotność komórek i ich zdolność do tworzenia kolonii (Ma i in., 2018).

Istnieją również dowody, że HMGB1 może wzmacniać proces protekcyjnej autofagii w odpowiedzi na chemioterapię raka płuca. Zaobserwowano, że po ekspozycji komórek gruczolakoraka płuca na docetaksel białko HMGB1 ulegało przemieszczeniu z jąder komórkowych do cytoplazmy, co powodowało nasilenie procesu autofagii, a w konsekwencji zahamowanie apoptozy i oporność na docetaksel. Wyciszenie genu *HMGB1* za pomocą siRNA powodowało przywrócenie wrażliwości na docetaksel badanych komórek zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Pan i in., 2014). Zbieżne wyniki uzyskano również w innych badaniach (Zhang i in., 2015a; Zheng i in., 2016). Ekspozycja komórek A549 na cisplatynę zwiększała ilość cytoplazmatycznego i jądrowego białka HMGB1, a jego ilość była wyższa w cytoplazmie niż w jądrze (Zheng i in., 2016). Po zastosowaniu interferującego RNA specyficznego dla genu *HMGB1* w komórkach linii A549/DDP następowało zahamowanie procesu autofagii i nasilenie apoptozy oraz zwiększenie wrażliwości na cisplatynę (Zhang i in., 2015a). Użycie tej samej strategii uwrażliwiało komórki H460 na 5-fluorouracyl, cisplatynę i oksaliplatynę (Zheng i in., 2016). Udowodniono, że w gruczolakoraku płuca białko HMGB1 poprzez aktywację ścieżki sygnalizacyjnej MEK/ERK1/2 ułatwia powstawanie kluczowego dla tworzenia autofagosomów kompleksu białek Beclin-1-PI3K-III (Pan i in., 2014). Za regulację procesu autofagii w komórkach NSCLC odpowiedzialne jest również miR-142-3p o hamującym działaniu wobec genu *HMGB1*. Wspomniane miRNA hamuje proces autofagii wywołanej głodzeniem komórek NSCLC poprzez obniżanie ekspresji genu *HMGB1*, co w konsekwencji aktywuje ścieżkę sygnalizacji PI3K/AKT/mTOR. Nadekspresja miR-142-3p hamuje także proces autofagii wywołanej przez chemioterapeutyki i zwiększa chemowrażliwość komórek NSCLC zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Chen i in., 2017).

Z drugiej strony wykazano, że HMGB1 posiada właściwości indukujące odpowiedź przeciwnowotworową komórek układu immunologicznego. Gao i wsp. (2019) udowodnili, że docetaksel powoduje zależną od dawki indukcję ekspresji genu *HMGB1* i kodowanego przez niego białka *in vitro*. Następnie białko to poprzez sygnalizację zależną do NF- κ B indukuje uwalnianie CXCL11 (ang. *chemokine receptor ligand 11*) do mikrośrodowiska guza nowotworowego, co wzmacnia jego infiltrację przez limfocyty T CD8+. W zgodzie z tymi obserwacjami pozostają wyniki badań Haruna i wsp. (2020), którzy stwierdzili istotny wzrost stężenia białka HMGB1 w surowicy pacjentów z NSCLC po podaniu docetakselu. Dodatkowo makrofagi i komórki dendrytyczne pobrane z tkanki NSCLC i stymulowane *ex vivo* przez białko HMGB1 wykazywały zwiększoną ekspresję markera aktywacji CD86.

Po podaniu cisplatyny tworzone są addukty cisplatyna/DNA, których usuwanie pozwala komórkom nowotworowym uniknąć niszczącego działania chemioterapeutyku, a tym samym może wpływać na wyniki chemioterapii. Udowodniono, że w komórkach A549 z funkcjonalnym białkiem P53 naprawa adduktów DNA/cisplatyna jest uwarunkowana współdziałaniem białek HMGB1 i P53. Wykazano bowiem, że wyciszenie genu *HMGB1* nasila proces naprawy DNA, lecz tylko w obecności defektywnego białka P53 (Yusein-Myashkova i in., 2016).

Istnieją przesłanki, że wyniki chemioterapii w raku płuca mogą być determinowane przez polimorfizmy genu *HMGB1*, stanowiące potencjalne biomarkery efektywności chemioterapii opartej na związkach platyny. Wśród chorych na raka płuca w populacji chińskiej, którzy otrzymali co najmniej dwa cykle chemioterapii pierwszej linii opartej na związkach platyny, wykazano zależność

między polimorfizmami rs1412125 i rs2249825 genu *HMGB1* a odpowiedzią na tę chemioterapię. Obecność genotypu TT bądź CT dla rs1412125 wiązała się z ponad trzykrotnie, a obecność genotypu GC lub CC dla rs2249825 z ponad dziesięciokrotnie wyższym ryzykiem braku odpowiedzi na to leczenie (w porównaniu odpowiednio do genotypu CC i GG). Analogiczny wynik dla rs1412125 uzyskano w podgrupie chorych powyżej 55. roku życia (blisko pięciokrotny wzrost ryzyka). Związku z wynikami chemioterapii nie stwierdzono natomiast dla trzeciego badanego polimorfizmu genu *HMGB1* rs1045411 (Wang i in., 2014).

Choć chemioterapia jest szeroko stosowanym podejściem w leczeniu nowotworów, może przyczyniać się do powstawania przerzutów. Powoduje ona m.in. selekcję klonów komórek opornych na chemioterapię lub powstawanie nowych mutacji klonalnych prowadzących do rozprzestrzeniania się nowotworu. Udowodniono, że białko *HMGB1* jest czynnikiem niezbędnym do powstawania przerzutów raka płuca indukowanych chemioterapią. Nukleosomy zawierające *HMGB1*, pochodzące z komórek nowotworowych ulegających apoptozie po chemioterapii, nasilały (w zależności od dawki) inwazyjność i zdolność do przerzutowania komórek nowotworowych. Zwiększenie inwazyjności łączyło się z nasileniem ekspresji genów *MMP-2* i *MMP-9* oraz zwiększeniem ilości kodowanych przez nie białek. Podanie takich nukleosomów myszom przed wszczepieniem im ludzkich komórek raka płuca powodowało nasilenie przerzutowania tego nowotworu *in vivo*, przy zaangażowaniu sygnalizacji zależnej od receptorów TLR4 i TLR9, dla których ligandami są odpowiednio *HMGB1* i nukleosomy. U pacjentów poddanych chemioterapii stężenie krążących nukleosomów połączonych z *HMGB1* w surowicy było wyższe niż u osób nie poddanych takiemu leczeniu. Wyższe stężenie wspomnianych nukleosomów było też związane z niskim zróżnicowaniem komórek nowotworowych, nasiloną inwazyjnością nowotworu i wyższymi stopniami zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM (Wang i in., 2018).

W czasie ostatnich kilkunastu lat przeprowadzono liczne badania, które miały ocenić potencjalną kliniczną użyteczność oznaczania ekspresji genu *HMGB1* bądź białka *HMGB1* w tkance raka płuca, surowicy lub popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych jako czynnika prognostycznego w NSCLC. Wyniki większości z tych badań zostały zebrane w dwóch metaanalizach (Feng i in., 2016; Xia i in., 2016). Nie wykazano w nich różnic w ekspresji białka *HMGB1* między głównymi typami histologicznymi NSCLC – gruczolakorakiem i rakiem płaskonabłonkowym. Obecność białka *HMGB1* w tkance nowotworowej różnicowała natomiast przypadki NSCLC z zajęciem węzłów chłonnych i bez przerzutów. Metaanalizę Feng i wsp. (2016) uzupełniono także o dane mikromacierzowe uzyskane z baz Gene Expression Omnibus i ArrayExpress. Na tej podstawie stwierdzono, że poziom ekspresji genu *HMGB1* w tkance nowotworowej jest pozytywnie związany z wielkością guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, przerzutów odległych, stopniem zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji TNM. Wyższe poziomy tej ekspresji występują istotnie częściej w raku płaskonabłonkowym niż gruczolakoraku płuca. Dalsze analizy danych z The Cancer Genome Atlas wykazały, że nadekspresja genu *HMGB1* jest związana z krótszym całkowitym i wolnym od choroby czasem przeżycia chorych z gruczolakorakiem płuca, nie ma natomiast związku z tymi czasami w przypadkach raka płaskonabłonkowego. Przytoczone powyżej wyniki sugerują, że poziom ekspresji genu *HMGB1* może być obiecującym czynnikiem pozwalającym na prognozowanie przebiegu raka płuca.

Dwa spośród badań zawartych w przedstawionych wcześniej metaanalizach przeprowadzono w populacji polskiej i dotyczyły one prognostycznego znaczenia białka *HMGB1* oznaczanego

w surowicy chorych z NSCLC. Naumnik i wsp. (2009) stwierdzili występowanie wyższego surowiczego stężenia białka HMGB1 u osób z zaawansowanym NSCLC (stopień IIIA lub IV wg TNM) w porównaniu z osobami zdrowymi. Stężenie to jednak nie było związane ze stopniem zaawansowania choroby, typem histologicznym nowotworu ani wynikami chemioterapii. Stężenie białka HMGB1 przed operacją nie miało związku z przeżywalnością pacjentów. Analiza przy użyciu krzywych ROC nie wykazała, aby stężenie HMGB1 przed chemioterapią było skutecznym czynnikiem diagnostycznym w różnicowaniu osób chorych z NSCLC i zdrowych.

W drugim badaniu dotyczącym polskiej populacji stwierdzono, że stężenie w surowicy białka HMGB1 było istotnie wyższe u osób z NSCLC niż w surowicy osób zdrowych czy pacjentów z sarkoidozą oraz pozytywnie korelowało ze stężeniem białka HMGB1 w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych. Wiązało się także z wiekiem (wyższe stężenia u osób poniżej 60. roku życia) i było związane z płcią pacjentów NSCLC (wyższe stężenie u mężczyzn). Natomiast wysokie stężenie HMGB1 w popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych było związane z obecnością przerzutów odległych. Wysokie stężenia HMGB1 w tym materiale u pacjentów z NSCLC o stopniu zaawansowania IIIB było związane z gorszą przeżywalnością. Stwierdzono także negatywną zależność między stężeniem HMGB1 w surowicy pacjentów nie odpowiadających na terapię i ich przeżywalnością. Istniała natomiast pozytywna korelacja stężeń białek HMGB1 i TGF- β zarówno w surowicy, jak i popłuczynach oskrzelikowo-pęcherzykowych (Jakubowska i in., 2015).

Stężenie HMGB1 w płynie z jamy opłucnej było istotnie wyższe u chorych z gruczolakorakiem niż rakiem płaskonabłonkowym płuca. Nie wykazano natomiast różnic w odniesieniu do płci, wieku czy statusu palenia pacjentów (Ma i in., 2018).

Prognostycznego znaczenia w raku płuca poszukiwano także dla polimorfizmów genu *HMGB1*, które mogłyby zmieniać poziom jego ekspresji, a przez to wpływać na przebieg procesu nowotworzenia. Analiza w podgrupach pacjentów z różnymi typami histologicznymi raka płuca dowiodła, że osoby posiadające co najmniej jeden allel C dla polimorfizmu rs1045411 genu *HMGB1* wykazywały zmniejszone ryzyko gruczolakoraka o około 25% i raka drobnokomórkowego o ok. 40% w porównaniu z homozygotami TT. Udowodniono też, że obecność genotypu AG bądź GG jest związana ze zmniejszeniem o 23% ryzyka wystąpienia gruczolakoraka. Dodatkowo nie wykazano związku między żadnym z dwóch badanych polimorfizmów a czasem przeżycia wśród chorych z rakiem płuca. Również rozkład genotypów dla tych polimorfizmów nie różnił się między podgrupami chorych o różnym zaawansowaniu klinicznym nowotworu (Jiang i in., 2018c).

Dowiedziano, że współwystępowanie mutacji genów *EGFR* i *HMGB1* może mieć związek ze stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu. Wśród chorych ze zmutowanym genem *EGFR* osoby posiadające co najmniej jeden allel C dla rs1360485 *HMGB1* (genotypy TC + CC) wykazywały zwiększone ponad pięciokrotnie ryzyko rozwoju raka płuca o niskim zróżnicowaniu w porównaniu z osobami homozygotycznymi TT. Dodatkowo ten SNP w grupie chorych palaczy z mutacjami genu *EGFR* był związany z podatnością na rozwój raka niskozróżnicowanego (Wu i in., 2019b).

5. Podsumowanie

Badania wykazały, że ekspresja genów *HMGA1*, *HMGA2* i *HMGB1*, jak również ilość kodowanych przez nie białek ulegają zwiększeniu w tkance raka płuca w stosunku do prawidłowych tkanek tego narządu. Wiąże się to z funkcją tych cząsteczek w przebiegu nowotworzenia, ich udziałem w takich procesach jak proliferacja, apoptoza, migracja i przerzutowanie. Znaczna część przeprowadzonych analiz wskazuje na związek poziomu ekspresji genów *HMGA1*, *HMGA2* i *HMGB1*

27

i ilości kodowanych przez nie białek w tkance raka płuca z cechami kliniczno-patologicznymi, jak obecność przerzutów, stopień zaawansowania klinicznego, stopień zróżnicowania histologicznego, a także z czasem przeżycia pacjentów. Wskazuje to na potencjalną użyteczność oznaczania tych parametrów jako czynników prognostycznych. Dowiedziona rola omawianych białek w odpowiedzi komórek na chemioterapię daje możliwość wykorzystania tych cząsteczek w leczeniu raka płuca.

Finansowanie: Praca była finansowana z środków statutowych Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej (503/3-015-02/503-31-001-19-00).

Podziękowania: Abstrakt graficzny pobrano ze strony Protein Data Bank in Europe <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2eze> (dostęp: 26.02.2021). Wykorzystana grafika została opublikowana po raz pierwszy w: Huth J.R., Bewley C.A., Nissen M.S., Evans J.N., Reeves R., Gronenborn A.M., Clore G.M. 1997. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nature Structural Biology* 4, str. 657–65. DOI: [10.1038/nsb0897-657](https://doi.org/10.1038/nsb0897-657).

Bibliografia

- Alam M., Ahmad R., Rajabi H., Kufe D. 2015. MUC1-C induces the LIN28B–LET-7-HMGA2 axis to regulate self-renewal in NSCLC. *Molecular Cancer Research* 13(3), str. 449–460. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0363>
- Balcerczak E., Balcerczak M., Mirowski M. 2005. Białka HMGA i ich geny jako potencjalne biomarkery nowotworowe. *Postępy Biochemii* 51(3), str. 261–269.
- Barh D., Jain N., Tiwari S., Field J.K., Padin-Iruegas E., Ruibal A., López R., Herranz M., Bhattacharya A., Juneja L. i in. 2013. A novel in silico reverse-transcriptomics-based identification and blood-based validation of a panel of sub-type specific biomarkers in lung cancer. *BMC Genomics* 14 (Suppl 6), S5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S6-S5>
- Chen Y., Zhou X., Qiao J., Bao A. 2017. MiR-142-3p overexpression increases chemo-sensitivity of NSCLC by inhibiting HMGB1-mediated autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry* 41(4), str. 1370–1382. <https://doi.org/10.1159/000467896>
- Dai F.Q., Li C.R., Fan X.Q., Tan L., Wang R.T., Jin H. 2019. miR-150-5p Inhibits Non-Small-Cell Lung Cancer Metastasis and Recurrence by Targeting HMGA2 and β -Catenin Signaling. *Molecular Therapy – Nucleic Acids* 16, str. 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.04.017>
- Di Cello F., Hillion J., Hristov A., Wood L.J., Mukherjee M., Schuldenfrei A., Kowalski J., Bhattacharya R., Ashfaq R., Resar L.M.S. 2008. HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. *Molecular Cancer Research* 6(5), str. 743–750. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0095>
- Di Fazio P., Maass M., Roth S., Meyer C., Grups J., Rixin P., Bartsch D.K., Kirschbaum A. 2017. Expression of hsa-let-7b-5p, hsa-let-7f-5p, and hsa-miR-222-3p and their putative targets HMGA2 and CDKN1B in typical and atypical carcinoid tumors of the lung. *Tumor Biology* 39(10), str. 1–8. <https://doi.org/10.1177/1010428317728417>
- Didkowska J., Wojciechowska U., Śliwczyński A. 2020. Raport dotyczący stopni zaawansowania, leczenia oraz przeżyć pacjentów chorych na raka płuca zgłoszonych do KRN w latach 2014–2016. Wersja 2, aktualizacja 14.04.2020. *Krajowy Rejestr Nowotworów*, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie. Dostępne online: http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Rak_pluca_2019.pdf (dostęp: 26.02.2021).
- Ding J., Cui X., Liu Q. 2017. Emerging role of HMGB1 in lung diseases: friend or foe. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21(6), str. 1046–1057. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13048>
- Eide H.A., Halvorsen A.R., Bjaanæs M.M., Piri H., Holm R., Solberg S., Jørgensen L., Brustugun O.T., Kiserud C.E., Helland Å. 2016. The MYCN-HMGA2-CDKN2A pathway in non-small cell lung carcinoma-differences in histological subtypes. *BMC Cancer* 16(1), str. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2104-9>
- Feng A., Tu Z., Tin B. 2016. The effect of HMGB1 on the clinicopathological and prognostic features of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7(15), str. 20507–20519. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7050>
- Fusco A., Fedele M. 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 7(12), str. 899–910. <https://doi.org/10.1038/nrc2271>
- Gao N., Wang F.X., Wang G., Zhao Q.S. 2018. Targeting the HMGA2 oncogene by miR-498 inhibits non-small cell lung cancer biological behaviors. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22(6), str. 1693–1699. <https://doi.org/10.26355/eurerv.201803.14582>
- Gao Q., Wang S., Chen X., Cheng S., Zhang Z., Li F., Huang L., Yang Y., Zhou B., Yue D. i in. 2019. Cancer-cell-secreted CXCL11 promoted CD8 + T cells infiltration through docetaxel-induced-release of HMGB1 in NSCLC. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7(1), str. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0511-6>

- Gao X., Dai M., Li Q., Wang Z., Lu Y., Song Z. 2017. HMGA2 regulates lung cancer proliferation and metastasis. *Thoracic Cancer* 8(5), str. 501–510. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12476>
- Gos M., Miłoszewska J., Przybyszewska M. 2009. Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Postępy Biochemii* 55(2), str. 121–128.
- Grzelewska-Rzymowska I. (red.) 2003. *Rak płuca*. Seria.
- Haruna M., Hirata M., Iwahori K., Kanazawa T., Yamamoto Y., Goto K., Kawashima A., Morimoto-Okazawa A., Funaki S., Shintani Y. i in. 2020. Docetaxel Upregulates HMGB1 Levels in Non-small Cell Lung Cancer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 43(3), str. 399–403. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00702>
- He W., Ju D., Jie Z., Zhang A., Xing X., Yang Q. 2018. Aberrant CpG-methylation affects genes expression predicting survival in lung adenocarcinoma. *Cancer Medicine* 7(11), str. 5716–5726. <https://doi.org/10.1002/cam4.1834>.
- Hillion J., Wood L.J., Mukherjee M., Bhattacharya R., Di Cello F., Kowalski J., Elbahloul O., Segal J., Poirier J., Rudin C.M. i in. 2009. Upregulation of MMP-2 by HMGA1 promotes transformation in undifferentiated, large-cell lung cancer. *Molecular Cancer Research* 7(11), str. 1803–1812. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0336>
- Hu W., Liu P.Y., Yang Y.C., Chen P.C., Su C.M., Chao C.C., Tang C.H. 2017. Association of HMGB1 gene polymorphisms with lung cancer susceptibility and clinical aspects. *International Journal of Medical Sciences* 14(12), str. 1197–1202. <https://doi.org/10.7150/ijms.20933>
- Jakubowska K., Naumnik W., Niklinska W., Chyczewska E. 2015. Clinical Significance of HMGB-1 and TGF- β Level in Serum and BALF of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 852, str. 49–58. https://doi.org/10.1007/5584_2015_115
- Jiang C., Cao Y., Lei T., Wang Y., Fu J., Wang Z., Lv Z. 2018a. MicroRNA-363-3p inhibits cell growth and invasion of non-small cell lung cancer by targeting HMGA2. *Molecular Medicine Reports* 17(2), str. 2712–2718. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8131>
- Jiang M., Li X., Quan X., Li X., Zhou B. 2018c. Single nucleotide polymorphisms in HMGB1 correlate with lung cancer risk in the northeast Chinese han population. *Molecules* 23(4), str. 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23040832>
- Kayser K., Dünwald D., Kazmierczak B., Bullerdiek J., Kaltne H., Zick Y., André S., Gabius H.J. 2003. Chromosomal aberrations, profiles of expression of growth-related markers including galectins and environmental hazards in relation to the incidence of chondroid pulmonary hamartomas. *Pathology Research and Practice* 199(9), str. 589–598. <https://doi.org/10.1078/0344-0338-00466>
- Kettunen E., Anttila S., Seppänen J.K., Karjalainen A., Edgren H., Lindström I., Salovaara R., Nissén A.M., Salo J., Mattson K. i in. 2004. Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: Expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 149(2), str. 98–106. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00300-5)
- Lin S.Y., Peng F. 2016. Association of SIRT1 and HMGA1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters* 11(1), str. 782–788. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3914>
- Liu P.L., Liu W.L., Chang J.M., Chen Y.H., Liu Y.P., Kuo H.F., Hsieh C.C., Ding Y.S., Chen W.W., Chong I.W. 2017. MicroRNA-200c inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of lung cancer by targeting HMGB1. *PLoS ONE* 12(7), str. 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180844>
- Liu P.L., Tsai J.R., Hwang J.J., Chou S.H., Cheng Y.J., Lin F.Y., Chen Y.L., Hung C.Y., Chen W.C., Chen Y.H. i in. 2010. High-mobility group box 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung

- cancer contributes to tumor cell invasiveness. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 43(5), str. 530–538. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0269OC>
- Liu Q., Huo Y., Zheng H., Zhao J., Jia L., Wang P. 2019. Ethyl pyruvate suppresses the growth, invasion and migration and induces the apoptosis of non-small cell lung cancer cells via the HMGB1/RAGE axis and the NF- κ B/STAT3 pathway. *Oncology Reports* 42(2), str. 817–825. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7176>
- Liu Yi, Du M., Song Y., Liu H., Xiang S. 2018. NAC1/HMGB1 signaling pathway is associated with epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis of lung cancer cell line. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 48(5), str. 559–564.
- Liu Yun, Hu X., Xia D., Zhang S. 2016. MicroRNA-181b is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits cell motility by directly targeting HMGB1. *Oncology Letters* 12(5), str. 4181–4186. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5198>
- Lv X., Yao L., Nie Y.Q., Xu X.Y. 2018. MicroRNA-520a-3p suppresses non-small-cell lung carcinoma by inhibition of High Mobility Group Box 1 (HMGB1). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22(6), str. 1700–1708. https://doi.org/10.26355/eurrev_201803_14583
- Ma Ying, Kang S., Wu X., Han B., Jin Z., Guo Z. 2018. Up-regulated HMGB1 in the pleural effusion of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients reduces the chemosensitivity of NSCLC cells. *Tumori* 104(5), str. 338–343. <https://doi.org/10.5301/tj.5000656>
- Ma Yu, Li X., Chen S., Du B., Li Y. 2019. MicroRNA-4458 suppresses migration and epithelial–mesenchymal transition via targeting HMGA1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Management and Research* 11, str. 637–649. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S185117>
- Marciniak M., Kołodziej J. (red.) 2010. *Rak płuca*. Termedia.
- Mayr C., Hemann M.T., Bartel D.P. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315(5818), str. 1576–1579. <https://doi.org/10.1126/science.1137999>
- Meyer B., Loeschke S., Schultze A., Weigel T., Sandkamp M., Goldmann T., Vollmer E., Bullerdiek J. 2007. HMGA2 Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecular Carcinogenesis* 46, str. 503–511. <https://doi.org/10.1002/mc>
- Naghizadeh S., Mansoori B., Mohammadi A., Kafil H.S., Mousavi Z., Sakhinia E., Baradaran B. 2019. Effects of HMGA2 gene downregulation by siRNA on lung carcinoma cell migration in A549 cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry* 120(4), str. 5024–5032. <https://doi.org/10.1002/jcb.27778>
- Nanduri R., Furusawa T., Bustin M. 2020. Biological functions of HMGN chromosomal proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 21(2), str. 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21020449>
- Naumnik W., Nilklińska W., Ossolińska M., Chyczewska E. 2009. Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 47(4), str. 703–709. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0025-z>
- Pallante P., Sepe R., Puca F., Fusco A. 2015. High mobility group a proteins as tumor markers. *Frontiers of Medicine* 2, str. 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00015>
- Pan B., Chen D., Huang J., Wang R., Feng B., Song H., Chen L. 2014. HMGB1-mediated autophagy promotes docetaxel resistance in human lung adenocarcinoma. *Molecular Cancer* 13(1), str. 1–18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-165>
- Panneerselvam J., Srivastava A., Muralidharan R., Wang Q., Zheng W., Zhao L., Chen A., Zhao Y.D., Munshi A., Ramesh R. 2016. IL-24 modulates the high mobility group (HMG) A1/miR222 /AKT signaling in lung cancer cells. *Oncotarget* 7(43), str. 70247–70263. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11838>

- Park S., Minai-Tehrani A., Xu C.X., Chang S.H., Woo M.A., Noh M.S., Lee E.S., Lim H.T., An G.H., Lee K.H. i in. 2010. Suppression of A549 lung cancer cell migration by precursor let-7g microRNA. *Molecular Medicine Reports* 3(6), str. 1007–1013. <https://doi.org/10.3892/mmr.2010.373>
- Reeves R., Adair J.E. 2005. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair* 4(8), 926–938. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.04.010>
- Reeves R., Beckerbauer L. 2001. HMG1 / Y proteins : flexible regulators of transcription and chromatin structure. 1519(1–2), str. 13–29. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00215-9)
- Rice S.J., Lai S.C., Wood L.W., Helsley K.R., Runkle E.A., Winslow M.M., Mu D. 2013. MicroRNA-33a mediates the regulation of high mobility group AT-hook 2 gene (HMGA2) by thyroid transcription factor 1 (TTF-1/NKX2-1). *Journal of Biological Chemistry* 288(23), str. 16348–16360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.474643>
- Rogalla P., Drechsler K., Schröder-Babo W., Eberhardt K., Bullerdiek J. 1998. HMGC expression patterns in non-small lung cancer and surrounding tissue. *Anticancer Research* 18(5A), str. 3327–3330.
- Sarhadi V.K., Wikman H., Salmenkivi K., Kuosma E., Sioris T., Salo J., Karjalainen A., Knuutila S., Anttila S. 2006. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *Journal of Pathology* 209(2), str. 206–212. <https://doi.org/10.1002/path.1960>
- Scala S., Portella G., Fedele M., Chiappetta G., Fusco A. 2000. Adenovirus-mediated suppression of HMG1(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(8), str. 4256–4261. <https://doi.org/10.1073/pnas.070029997>
- Scrima M., de Marco C., Fabiani F., Franco R., Pirozzi G., Rocco G., Ravo M., Weisz A., Zoppoli P., Ceccarelli M. i in. 2012. Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): New insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS ONE* 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030427>
- Sekimoto N., Suzuki A., Suzuki Y., Sugano S. 2017. Expression of miR-26a exhibits a negative correlation with HMGA1 and regulates cancer progression by targeting HMGA1 in lung adenocarcinoma cells. *Molecular Medicine Reports* 15(2), str. 534–542. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6053>
- Shang G.H., Jia C.Q., Tian H., Xiao W., Li Y., Wang A.H., Dong L., Lin D.J. 2009. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respiratory Medicine* 103(12), str. 1949–1953. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.05.019>
- Singh I., Mehta A., Contreras A., Boettger T., Carrro G., Wheeler M., Cabrera-Fuentes H.A., Bellusci S., Seeger W., Braun T. i in. 2014. Hmga2 is required for canonical WNT signaling during lung development. *BMC Biology* 12(1), str. 1–16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-21>
- Smolarczyk R., Cichoń T., Jarosz M., Szala S. 2012. HMGB1—its role in tumor progression and anticancer therapy. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)* 66, str. 913–920. <https://doi.org/10.5604/17322693.1021108>
- Sun J., Qiao Y., Song T., Wang H. 2019. MiR-495 suppresses cell proliferation by directly targeting HMGA2 in lung cancer. *Molecular Medicine Reports* 19(3), str. 1463–1470. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9773>
- Sun K.K., Ji C., Li X., Zhang L., Deng J., Zhong N., Wu X.Y.. 2013. Overexpression of high mobility group protein B1 correlates with the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells. *Molecular Medicine Reports* 7(5), str. 1678–1682. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1362>

- Sun X., Xu M., Liu H., Ming K. 2017. MicroRNA-219 is downregulated in non-small cell lung cancer and inhibits cell growth and metastasis by targeting HMGA2. *Molecular Medicine Reports* 16(3), str. 3557–3564. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7000>
- The Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer, W. H. O. 2020. *Lung Cancer – Fact Sheet*. Dostępne online: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> (dostęp: 25.02.2021).
- Thun M., Peto R., Boreham J., Lopez A.D. 2012. Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. *Tobacco Control* 21(2), str. 96–101. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2011-050294>
- Tu L., Long X., Song W., Lv Z., Zeng H., Wang T., Liu X., Dong J., Xu P. 2019. MiR-34c acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by inducing endoplasmic reticulum stress through targeting HMGB1. *Oncotargets and Therapy* 12, str. 5729–5739. <https://doi.org/10.2147/OTT.S206932>
- Vignali R., Marracci S. 2020. HMGA genes and proteins in development and evolution. *International Journal of Molecular Sciences* 21(2), str. 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms21020654>
- Wang B., Pan L.Y., Kang N., Shen, X.Y. 2020a. PP4R1 interacts with HMGA2 to promote non-small-cell lung cancer migration and metastasis via activating MAPK/ERK-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Carcinogenesis* 59(5), str. 467–477. <https://doi.org/10.1002/mc.23168>
- Wang C., Fei G., Liu Z., Li Q., Xu Z., Ren T. 2012. HMGB1 was a pivotal synergistic effector for CpG oligonucleotide to enhance the progression of human lung cancer cells. *Cancer Biology and Therapy* 13(9), str. 727–736. <https://doi.org/10.4161/cbt.20555>
- Wang K., Shan S., Wang S., Gu X., Zhou X., Ren T. 2018. HMGB1-containing nucleosome mediates chemotherapy-induced metastasis of human lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500(3), str. 758–764. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.150>
- Wang M., Gauthier A., Daley L.A., Dial K., Wu J., Woo J., Lin M., Ashby C., Mantell L.L. 2019. The Role of HMGB1, a Nuclear Damage-Associated Molecular Pattern Molecule, in the Pathogenesis of Lung Diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* 31(13), str. 954–993. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7818>
- Wang X.H., Zhang S.Y., Shi M., Xu X.P. 2020b. HMGB1 Promotes the Proliferation and Metastasis of Lung Cancer by Activating the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Technology in Cancer Research i Treatment* 19, str. 1–8. <https://doi.org/10.1177/1533033820948054>
- Wang Y., Li X.P., Yin J.Y., Zhang Y., He H., Qian C.Y., Chen J., Zheng Y., Smieszko K., Fu Y.L. et al. 2014. Association of HMGB1 and HMGB2 genetic polymorphisms with lung cancer chemotherapy response. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 41(6), str. 408–415. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12232>
- Wang Y.T., Pan S.H., Tsai C.F., Kuo T.C., Hsu Y.L., Yen H.Y., Choong W.K., Wu H.Y., Liao Y.C., Hong T.M. et al. 2017. Phosphoproteomics Reveals HMGA1, a CK2 Substrate, as a Drug-Resistant Target in Non-Small Cell Lung Cancer. *Scientific Reports* 7, str. 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep44021>
- Wikman H., Kettunen E., Seppänen J.K., Karjalainen A., Hollmén J., Anttila S., Knuutila S. 2002. Identification of differentially expressed genes in pulmonary adenocarcinoma by using cDNA array. *Oncogene* 21(37), str. 5804–5813. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205726>
- Wu D., Liu J., Chen J., He H., Ma H., Lv X. 2019a. MiR-449a suppresses tumor growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer by targeting a HMGB1-mediated NF- κ B signaling pathway. *Oncology Research*, 27(2), str. 227–235. <https://doi.org/10.3727/096504018X15213089759999>
- Wu L., Yang L. 2018. The function and mechanism of HMGB1 in lung cancer and its potential therapeutic implications. *Oncology Letter* 15(5), str. 6799–6805. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8215>

- Wu X.J., Chen Y.Y., Gong C.C., Pei D.S. 2018. The role of high-mobility group protein box 1 in lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 119(8), str. 6354–6365. <https://doi.org/10.1002/jcb.26837>
- Wu X., Chen Y., Guo W., Li T., Dong H., Wang W., Xie M., Ma G., Pei D. 2020. HMGB1 regulates SNAI1 during NSCLC metastasis, both directly, through transcriptional activation, and indirectly, in a RSF1-IT2-dependent manner. *Molecular Oncology* 14(6), str. 1348–1364. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12691>
- Wu X., Wang W., Chen Y., Liu X., Wang J., Qin X., Yuan D., Yu T., Chen G., Mi Y., Mou J., Cui J., Hu A., Yunxiang E., Pei D. 2018b. Glycyrrhizin Suppresses the Growth of Human NSCLC Cell Line HCC827 by Downregulating HMGB1 Level. *BioMed Research International* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6916797>
- Wu X., Wang W., Chen Y., Liu X., Wang J., Qin X., Yuan D., Yu T., Chen G., Mi Y. i in. 2018c. High Mobility Group Box Protein 1 Serves as a Potential Prognostic Marker of Lung Cancer and Promotes Its Invasion and Metastasis by Matrix Metalloproteinase-2 in a Nuclear Factor-B-Dependent Manner. *BioMed Research International* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3453706>
- Wu Y.L., Chien M.H., Chou Y.E., Chang J.H., Liu T.C., Tsao T.C.Y., Chou M.C., Yang S.F. 2019b. Association of EGFR mutations and HMGB1 genetic polymorphisms in lung adenocarcinoma patients. *Journal of Cancer* 10(13), str. 2907–2914. <https://doi.org/10.7150/jca.31125>
- Xia Q., Xu J., Chen H., Gao Y., Gong F., Hu L., Yang L. 2016. Association between an elevated level of HMGB1 and non-small-cell lung cancer: A meta-analysis and literature review. *OncoTargets and Therapy* 9, str. 3917–3923. <https://doi.org/10.2147/OTT.S104409>
- Xiao P., Liu W.L. 2015. MiR-142-3p functions as a potential tumor suppressor directly targeting HMGB1 in non-small-cell lung carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(9), str. 10800–10807.
- Xu L., Du B., Lu Q.J., Fan X.W., Tang K., Yang L., Liao W.L. 2018. miR-541 suppresses proliferation and invasion of squamous cell lung carcinoma cell lines via directly targeting high-mobility group AT-hook 2. *Cancer Medicine* 7(6), str. 2581–2591. <https://doi.org/10.1002/cam4.1491>
- Xu L., Liao W.L., Lu Q.J., Li C.G., Yuan Y., Xu Z.Y., Huang S.D., Chen H.Z. 2016. ANG Promotes Proliferation and Invasion of the Cell of Lung Squamous Carcinoma by Directly Up-Regulating HMGA2. *Journal of Cancer* 7(7), str. 862–871. <https://doi.org/10.7150/jca.14440>
- Yao S., Zhao T., Jin H. 2015. Expression of MicroRNA-325-3p and its potential functions by targeting HMGB1 in non-small cell lung cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 70(C), str. 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.013>
- Yong S.L., Dutta A. 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes and Development* 21(9), str. 1025–1030. <https://doi.org/10.1101/gad.1540407>
- Yusein-Myashkova S., Stoykov I., Gospodinov A., Ugrinova I., Pasheva E. 2016. The repair capacity of lung cancer cell lines A549 and H1299 depends on HMGB1 expression level and the p53 status. *Journal of Biochemistry* 160(1), str. 37–47. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw012>
- Zhang C., Ge S., Hu C., Yang N., Zhang J. 2013. MiRNA-218, a new regulator of HMGB1, suppresses cell migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45(12), str. 1055–1061. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt109>
- Zhang R., Tao F., Ruan S., Hu M., Hu Y., Fang Z., Mei L., Gong C. 2019. The TGFβ1-FOXM1-HMGA1-TGFβ1 positive feedback loop increases the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by inducing G6PD expression. *American Journal of Translational Research* 11(11), str. 6860–6876.

- Zhang R., Li Y., Wang Z., Chen L., Dong X., Nie X. 2015a. Interference with HMGB1 increases the sensitivity to chemotherapy drugs by inhibiting HMGB1-mediated cell autophagy and inducing cell apoptosis. *Tumor Biology* 36(11), str. 8585–8592. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3617-6>
- Zhang Y., Ma T., Yang S., Xia M., Xu J., An H., Yang Y., Li S. 2011. High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 357(1-2), str. 363–371. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0907-1>
- Zhang Z., Wang Q., Chen F., Liu J. 2015b. Elevated expression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of non-small cell lung cancer. *Tumor Biology* 36(2), str. 1213–1219. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2749-4>
- Zheng H., Chen J.N., Yu X., Jiang P., Yuan L., Shen H.S., Zhao L.H., Chen P.F., Yang M. 2016. HMGB1 Enhances Drug Resistance and Promotes in Vivo Tumor Growth of Lung Cancer Cells. *DNA and Cell Biology* 35(10), str. 622–627. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3360>
- Zhou X., Zhang Z., Liang X. 2020. Regulatory network analysis to reveal important miRNAs and genes in non-small cell lung cancer. *Cell Journal* 21(4), str. 459–466. <https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6281>
- Zhu J., Luo J., Li Y., Jia M., Wang Y., Huang Y., Ke S. 2016. HMGB1 induces human non-small cell lung cancer cell motility by activating integrin $\alpha\beta3$ /FAK through TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 480(4), str. 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.052>



© 2021 Lias Saed, Ewa Olechnowicz, Ewa Balcerczak, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Opublikowane na licencji Creative Commons Uznanie Autorstwa (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pl>).

Article

Prognostic Significance of *HMGAI* Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis

Lias Saed, Agnieszka Jeleń , Marek Mirowski and Aleksandra Sałagacka-Kubiak * 

Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; lias.saed@umed.lodz.pl (L.S.); agnieszka.jelen@umed.lodz.pl (A.J.); marek.mirowski@umed.lodz.pl (M.M.)

* Correspondence: aleksandra.salagacka@umed.lodz.pl

Abstract: High-mobility group protein 1 (HMGAI) participates in the processes of DNA transcription, replication, recombination, and repair. The *HMGAI* gene is expressed abundantly during embryogenesis and is reactivated during carcinogenesis. *HMGAI* gene expression has been associated with a high degree of malignancy, metastatic tendency, and poor survival in breast, colon, ovary, and pancreatic cancers. However, its prognostic significance in lung cancer remains unclear. Using publicly available data, *HMGAI* was shown to be overexpressed in both small and non-small lung tumors, with higher expression compared to both the adjacent non-malignant lung tissues and non-tumor lung tissues of healthy individuals. Elevated *HMGAI* expression could result from lowered *HMGAI* methylation and was connected with some clinicopathological features like sex, age, and stage of the disease. The high *HMGAI* expression level was connected with shorter overall and first progression survival time among lung adenocarcinoma patients, but not lung squamous cell carcinoma patients. *HMGAI* could interact with proteins involved in cellular senescence and cell cycle control (TP53, RB1, RPS6KB1, and CDK1), transcription regulation (EP400 and HMGAI2), chromatin assembly and remodeling (LMNB1), and cholesterol and isoprene biosynthesis (HMGCR and INSIG1). Taken together, *HMGAI* overexpression could be an essential element of lung carcinogenesis and a prognostic feature in lung cancer.

Keywords: high-mobility group protein; methylation; prognosis; survival; protein–protein interaction network



Citation: Saed, L.; Jeleń, A.; Mirowski, M.; Sałagacka-Kubiak, A. Prognostic Significance of *HMGAI* Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6933. <https://doi.org/10.3390/ijms23136933>

Academic Editor: Agustin F. Fernandez

Received: 1 June 2022

Accepted: 18 June 2022

Published: 22 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Despite recent advances in the understanding of the molecular pathogenesis and treatment of lung cancer, it remains one of the most commonly diagnosed and most deadly neoplasms worldwide [1]. Among lung cancer patients, survival is strongly influenced by the clinical stage. Unfortunately, due to the lack of efficient diagnostic methods, early detection of cancer, when currently available treatment schemes are most effective, is rare. The development of lung cancer is a multi-annual and multi-stage process that could be initiated by several carcinogens, as well as by hormonal and genetic features [2,3]. However, too little is still known about host factors facilitating the initiation and progression of tumor development and determining the individual response to treatment. Thus, the search for new, more effective, and precise molecular diagnostic and prognostic markers, as well as drug targets, for lung cancer is an urgent need.

High-mobility group protein 1 (HMGAI) is a non-histone chromosomal protein involved in the processes of DNA transcription, replication, recombination, and repair. As the HMGAI protein regulates gene expression and alters the structure of chromatin, it has been described as an architectural transcription factor. It possesses three independent domains (AT-hook) in its structure; these bind to the minor groove of the DNA double helix in the regions of promoters and sequences enhancing the transcription of genes rich

in AT sequences [4,5]. The *HMGA1* gene is expressed abundantly during embryogenesis, but at low or even undetectable levels in mature differentiated tissues [6]. The gene is also reactivated during the process of cancer formation. *HMGA1* overexpression has been noted in breast, colon, ovarian, and pancreatic cancer, among others [7]. For many malignant neoplasms, the *HMGA1* gene has been associated with a high degree of malignancy, resistance to chemotherapy, metastatic tendency, and low patient survival [8]. Studies also show that *HMGA1* has oncogenic properties in cultured cells and transgenic mice, but how the protein leads to neoplastic transformation is not fully elucidated [8,9].

The data about the role of the *HMGA1* gene and its protein in lung cancer pathogenesis and prognostication is also limited. Expression of both the *HMGA1* gene and the *HMGA1* protein has been found to be upregulated in various lung cancer cell lines in comparison with normal human lung bronchial epithelium [10,11]. Correspondingly, higher expression of the *HMGA1* gene has been noted in most primary lung tumors compared to normal lung tissue [10–12]. *HMGA1* protein was found in an increased amount in metaplasia, dysplasia, and carcinoma in situ of the bronchial epithelium [13]. High *HMGA1* protein expression in NSCLC tissue was connected with a higher TNM stage [14] and *HMGA1* gene overexpression with shorter overall survival [11] and increased *HMGA1* protein levels [15] in tumor tissue among NSCLC patients. However, some contradictory findings were also published [16]. Taken together, it appears that *HMGA1* can play an important role in pulmonary carcinogenesis and also could be a promising prognostic biomarker or therapeutic target in lung cancer. However, the above-mentioned studies were conducted in relatively small sample groups with different methodologies; as such, it is not possible to draw clear conclusions about the significance of *HMGA1* for lung cancer.

Therefore, the present study attempts to integrate data about *HMGA1* gene expression in lung cancer from several publicly available databases. A variety of bioinformatical analyses were performed, including screening for *HMGA1* expression levels across different malignant tumors, comparing *HMGA1* expression between lung cancer and normal pulmonary tissue, evaluating the association between the level and lung cancer clinical features and prognosis, and constructing a functional network of the *HMGA1* protein.

2. Results

2.1. An Increase in *HMGA1* mRNA Expression Level and *HMGA1* Protein Amount Is Common in Multiple Carcinomas

First, the differential expression of the *HMGA1* between various cancers and noncancerous tissues from healthy individuals was assessed via the OncoPrint platform (Figure 1). As shown in Figure 1, increased mRNA expression (red) was observed in most of the analyzed cancers, e.g., in bladder, breast, ovarian, and gastrointestinal tumors. Eleven of 34 analyses in 9 of 14 datasets collected in OncoPrint found *HMGA1* to belong to 10% of the top overexpressed genes in lung cancer. A similar observation was made using the TIMER2.0 database (Figure 2A) where lung cancer was found to be among the neoplasms most significantly overexpressing the *HMGA1* ($p < 0.001$). Analysis of RNA-seq data available via the TMNplot web tool produced similar results to those described above (Figure 2B). These elevated mRNA expression levels were associated with an increase in *HMGA1* protein levels compared to non-cancerous tissue in the investigated cancer types (Figure 3). One exception was renal clear cell carcinoma, where a decrease in *HMGA1* protein was accompanied by a decline in *HMGA1* mRNA expression.

2.2. *HMGA1* Is Overexpressed in Lung Cancer in Comparison to Both Adjacent and Unpaired Normal Lung Tissue

The TMNplot platform tool was used to compare the *HMGA1* expression level between paired lung cancer tumors and adjacent normal tissue collected from the same patients and between non-paired tumors and normal lung tissues collected from separate subject cohorts. Statistically significant overexpression of the studied gene was noted in the cancerous tissue in comparison to both adjacent and unpaired lung tissue ($p = 1.36 \times 10^{-29}$ and $p = 8.66 \times 10^{-54}$, respectively). Significantly higher *HMGA1* expression was also stated

in both lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma compared to adjacent samples ($p = 5.19 \times 10^{-10}$ and $p = 1.66 \times 10^{-9}$, respectively) and unpaired samples ($p = 3.59 \times 10^{-96}$ and $p = 1.36 \times 10^{-152}$, respectively).

Analysis Type by Cancer	Cancer vs. Normal	
	Increased	Decreased
Bladder Cancer	4	
Brain and CNS Cancer		
Breast Cancer	8	
Cervical Cancer		
Colorectal Cancer	4	
Esophageal Cancer		
Gastric Cancer	3	
Head and Neck Cancer		
Kidney Cancer		2
Leukemia	2	3
Liver Cancer	3	
Lung Cancer	11	
Lymphoma	2	
Melanoma	1	
Myeloma		
Other Cancer		
Ovarian Cancer	8	
Pancreatic Cancer	2	
Prostate Cancer		
Sarcoma		1
Significant Unique Analyses	48	6
Total Unique Analyses	355	



Figure 1. Differential mRNA level of *HMGA1* in 20 types of cancer compared to matched normal tissue in the Oncomine. Significantly ($p < 0.05$) increased and decreased levels of *HMGA1* are indicated in red and blue, respectively. The intensity of cell color is determined by the best gene rank percentile for the analyses within the cell. The number in each cell represents the number of analyses that meet the given thresholds within the analysis and cancer types.

The right-sided bar charts in Figures 4 and 5 also provide a graphical representation of the sensitivity and specificity of *HMGA1* expression level at the major cut-offs set on the base of the range of the *HMGA1* expression level in normal samples. In lung cancer samples, a combination of the highest sensitivity and specificity was found at the third quartile cut-off when referencing adjacent normal tissue (Figure 4A) and at the median cut-off when referencing unpaired normal tissue (Figure 5A). When the lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma subtypes are analyzed individually, even better sensitivity and specificity values were calculated at the third quartile cut-off, referencing both adjacent and unpaired normal tissues (Figures 4B and 5B).

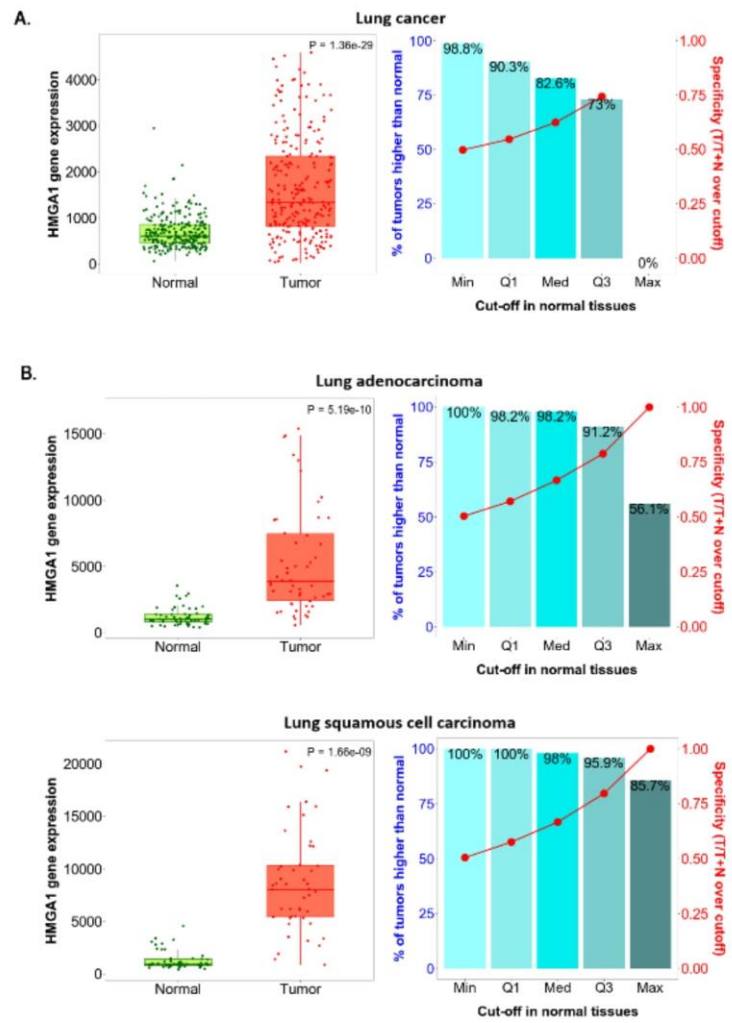


Figure 4. *HMGA1* expression level in paired tumor and adjacent normal tissue by TNMplot. (A) Gene chip data for lung cancer. (B) RNA-Seq data for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

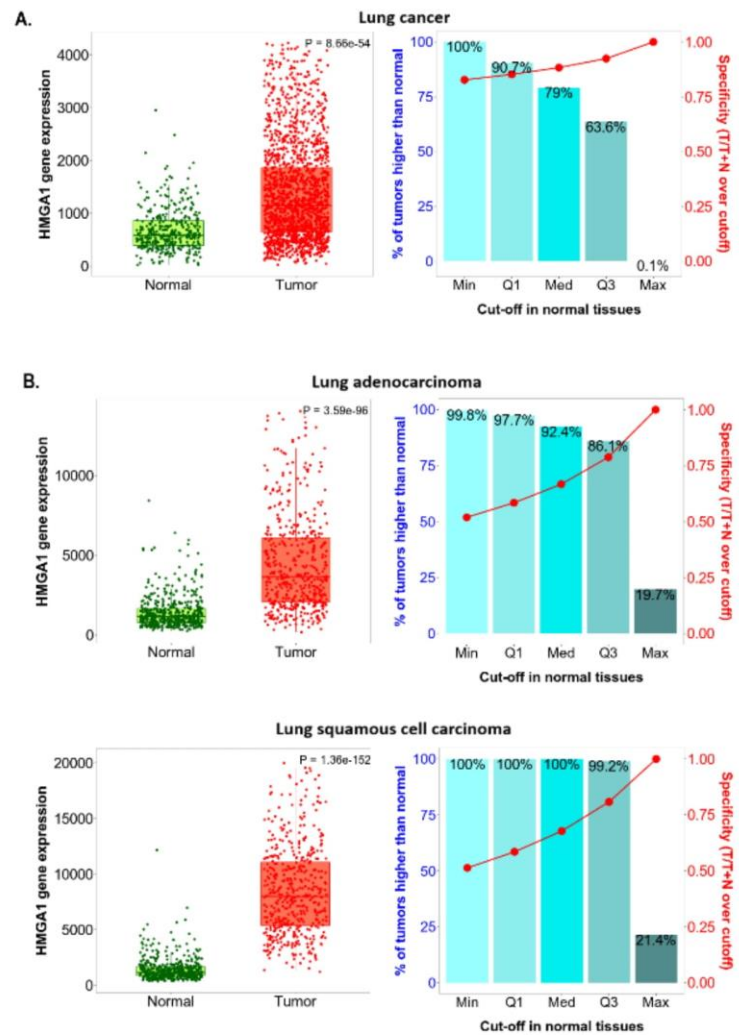


Figure 5. *HMGA1* expression level in non-paired tumor and normal tissue by TNMplot. (A) Gene chip data for lung cancer. (B) RNA-Seq data for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

2.3. *HMGA1* Is Widely Overexpressed in Different Histological Types of Lung Tumour

The histological characteristics of the lung cancer tissue substantially influence the behavior of neoplastic cells, determine cancer prognosis, and direct treatment regimens applied. Thus, we explored the *HMGA1* mRNA expression data from Oncomine related to small cell lung cancer, the main three subtypes of non-small cell lung cancer, and lung carcinoids. Consistent *HMGA1* overexpression was found across different non-small cell lung cancer subtypes: adenocarcinoma (Figure 6A), squamous cell carcinoma (Figure 6B), and large cell carcinoma (Figure 6C). *HMGA1* upregulation was observed in small cell carci-

noma, but without statistical significance (Figure 6D). Contrarily, no significant difference in *HMGA1* expression level was detected between lung carcinoid tumors and non-cancerous lung tissue (Figure 6E).

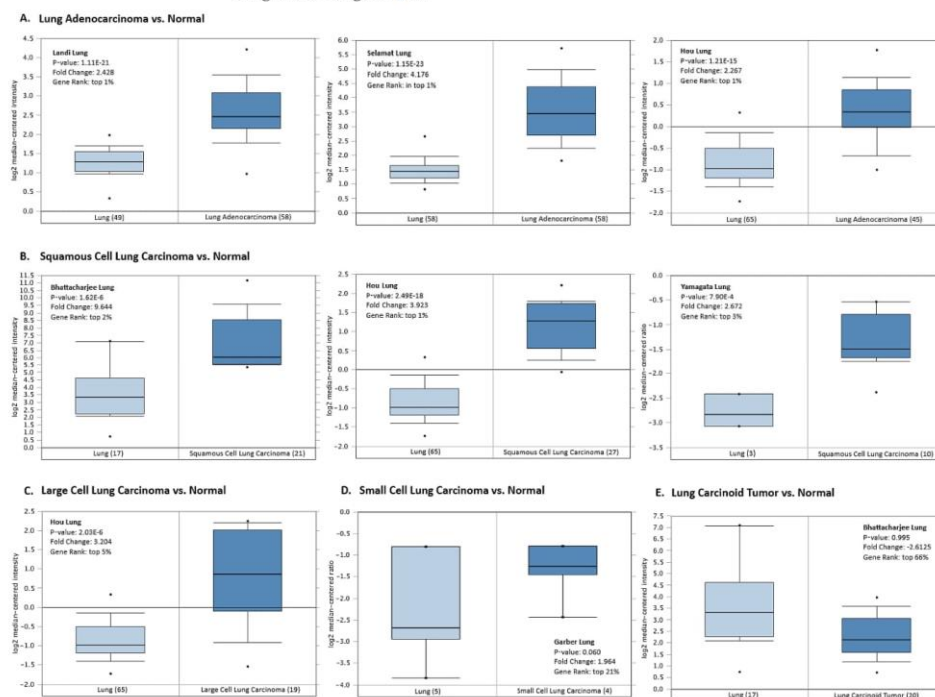


Figure 6. *HMGA1* expression level in normal lung tissue and different histological subtypes of lung neoplasm by OncoPrint platform. The analysis is shown for (A) lung adenocarcinoma (Landi Lung, Selemat Lung, Hou Lung), (B) squamous cell lung carcinoma (Bhattecharjee Lung, Hou Lung, Yamagata Lung), (C) large cell lung carcinoma (Hou Lung), (D) small cell lung carcinoma (Garber Lung), and (E) lung carcinoid tumor (Yamagata Lung).

The study also examined whether an increase in *HMGA1* mRNA expression in lung cancer is followed by an elevation of HMGA1 protein. Indeed, statistically significant correlations found between mRNA expression score and protein abundance for lung cancer data collected by cBioPortal. An increase in *HMGA1* mRNA level was associated with a proportional gain in the HMGA1 protein amount in both lung adenocarcinoma (R Spearman 0.40, $p < 0.001$; R Pearson 0.45 $p < 0.001$; Figure 7A) and lung squamous cell carcinoma (R Spearman 0.61, $p < 0.001$; R Pearson 0.54, $p < 0.001$; Figure 7B).

2.4. *HMGA1* Expression Level in Lung Cancer Could Be Connected with Methylation Status but Not with DNA Alterations of the *HMGA1* Gene

HMGA1 overexpression observed at the mRNA level is a common feature of lung cancer. One of the reasons for this may be changes in the sequence or the copy number of the *HMGA1* gene. Therefore, OncoPrint was generated by using cBioPortal to query 7276 patients/7799 samples from 27 studies (Figure 8A). It revealed that *HMGA1* gene alterations were stated in only 1.1% of lung cancer patients profiled for copy number changes, mutations, and structural variants of the gene, namely in about 1.5% of lung

adenocarcinoma and 0.5% of lung squamous cell carcinoma cases. Among them, the most frequently detected were gene amplification, with deep deletions less frequently (Figure 8B). The only mutation reported was the T75S missense mutation in lung adenocarcinoma (Figure 8C). The data from OncoPrint confirmed no substantial change in copy number variation of *HMGA1* across different lung cancer subtypes (Figure 9). However, plotting *HMGA1* expression level against copy number alterations clearly showed an increase in the level from deep deletion to amplification (Figure 10A). A statistically significant positive correlation was noted between *HMGA1* expression level and log2 copy-number value (R Spearman 0.24, $p < 0.001$; R Pearson 0.28, $p < 0.001$; Figure 10B).

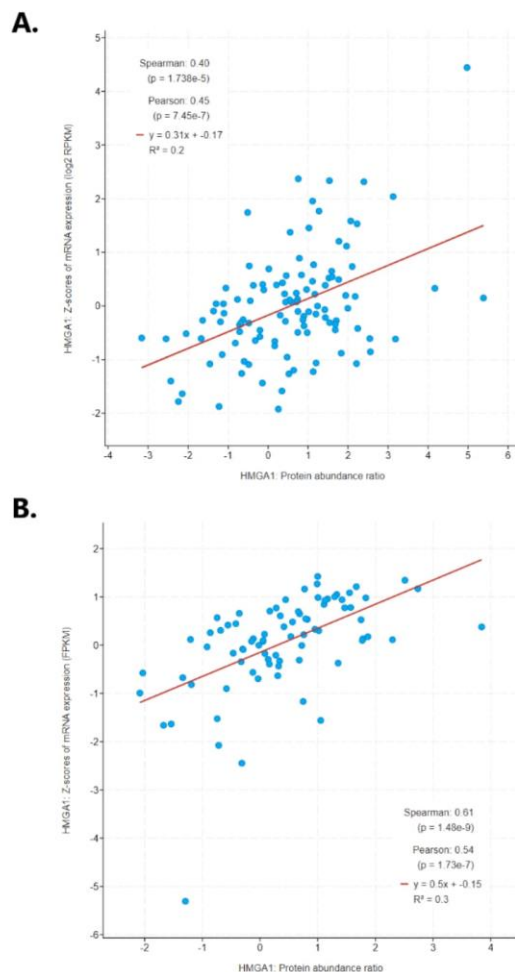


Figure 7. Correlation between the *HMGA1* mRNA expression level and *HMGA1* amount ratio in (A) lung adenocarcinoma and (B) lung squamous cell carcinoma, calculated using cBioPortal.

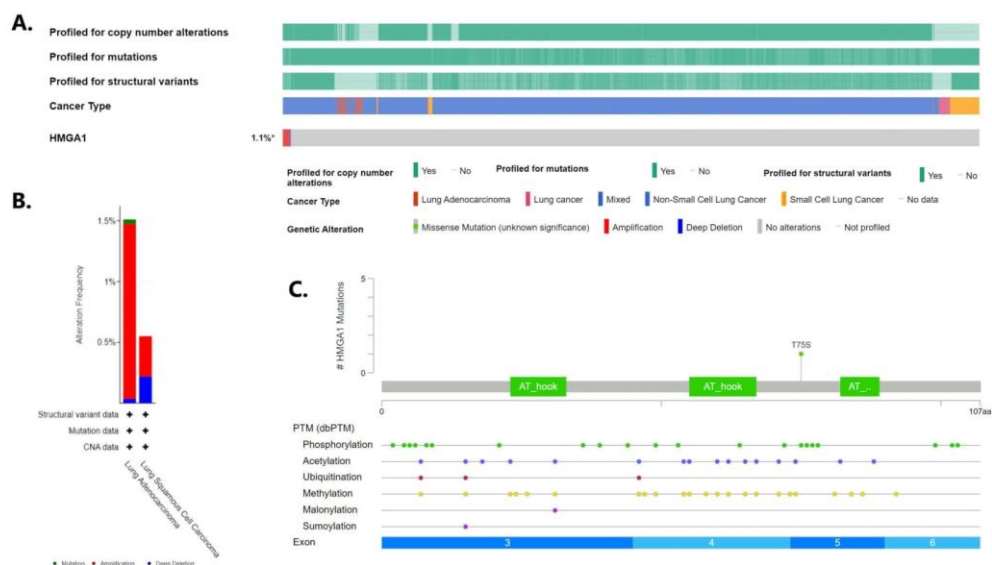


Figure 8. Genomic alterations of *HMGA1* in lung cancer according cBioPortal. (A) Oncoprint of the *HMGA1* in lung cancer, (B) Incidence of different alterations according to NSCLC types, (C) Details of *HMGA1* missense mutation found in lung adenocarcinoma.

As mutations or copy number changes of the *HMGA1* appear to occur rarely in lung cancer, potential causes of *HMGA1* overexpression were sought. Since DNA methylation can change the gene activity without changing the sequence, the connection between the *HMGA1* expression level and DNA methylation profile in lung cancer was inspected using cBioPortal. The significant negative correlation between the mentioned features was stated (R Spearman -0.44 , $p < 0.001$; R Pearson -0.37 , $p < 0.001$; Figure 11A). The results regarding *HMGA1* promoter methylation yielded by the UALCAN database were consistent with this association. For both the lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma promoter, the methylation level was substantially lowered in the tumor tissue in comparison to normal lung tissue ($p < 0.001$ for both cancer subtypes, Figure 11B).

2.5. *HMGA1* Expression Level Is Connected with Selected Clinical Parameters in Lung Cancer

Many factors, including the extent of the spread of neoplastic cells in the body or their histological differentiation, affect the outcome of lung cancer patients. Therefore, to evaluate the clinical significance of the *HMGA1* expression level in lung cancer, *HMGA1* expression level was compared with selected clinicopathological features: age, sex, population affinity, smoking status, TNM stage, and nodal involvement separately in lung adenocarcinoma (Figure 12A) and squamous cell carcinoma (Figure 12B) with the usage of the UALCAN database.

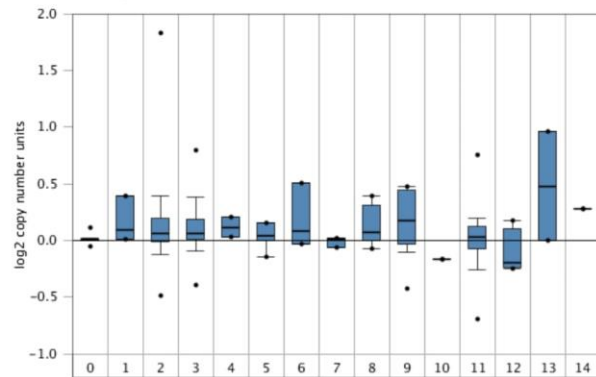
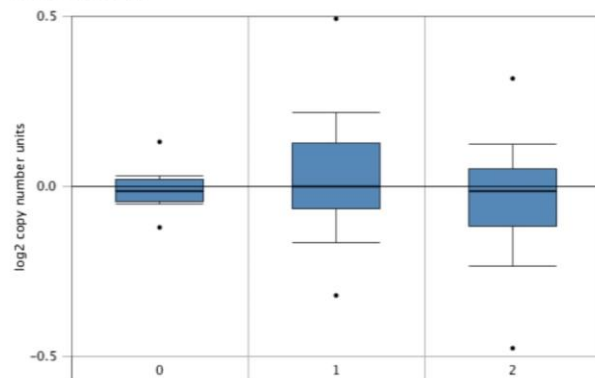
A. TCGA Lung 2**B. Weiss Lung**

Figure 9. *HMGA1* copy number in normal lung tissue and different histological subtypes of lung neoplasm by Oncomine: (A) TCGA lung 2: 0. normal lung ($n = 810$), 1. acinar lung ($n = 6$), 2. lung adenocarcinoma ($n = 261$), 3. lung adenocarcinoma, mixed subtype ($n = 67$), 4. lung clear cell adenocarcinoma ($n = 2$), 5. lung mucinous adenocarcinoma ($n = 6$), 6. micropapillary lung adenocarcinoma ($n = 3$), 7. mucinous bronchioloalveolar carcinoma ($n = 3$), 8. non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma ($n = 9$), 9. papillary lung adenocarcinoma ($n = 10$), 10. solid lung adenocarcinoma ($n = 1$), 11. squamous cell lung carcinoma ($n = 348$), 12. squamous cell lung carcinoma, basaloid variant ($n = 8$), 13. squamous cell lung carcinoma, papillary variant ($n = 2$), 14. squamous cell lung carcinoma, small cell variant ($n = 1$); (B) Weiss lung: 0. normal lung ($n = 59$), 1. lung adenocarcinoma ($n = 77$), 2. squamous cell lung carcinoma ($n = 155$).

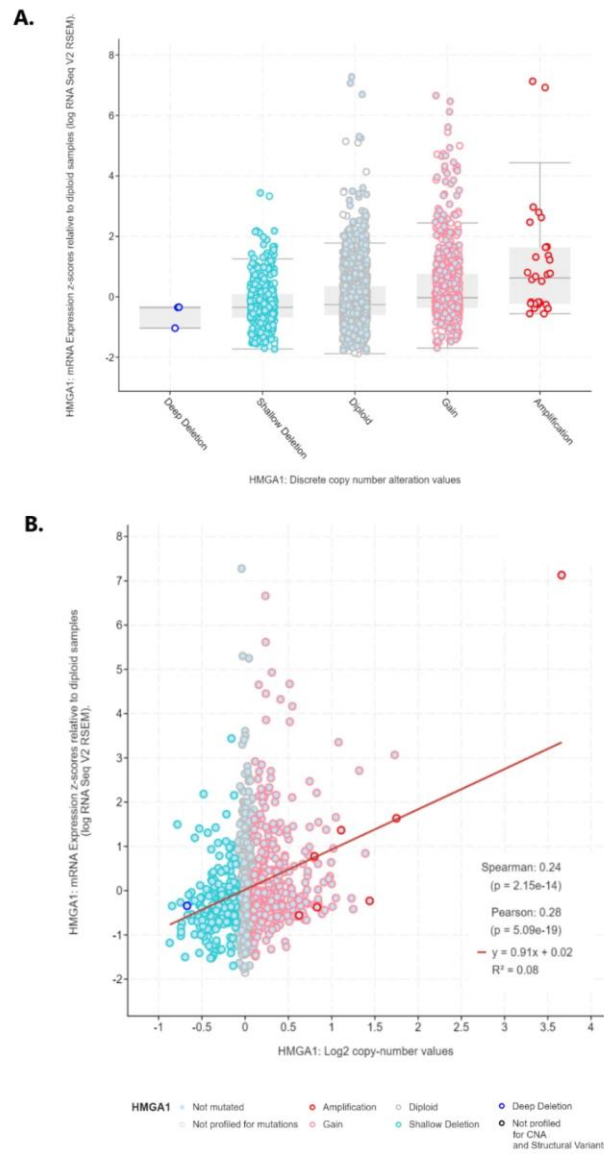


Figure 10. Association between *HMGA1* mRNA expression level and (A) discrete copy number alterations, (B) log2 copy-number value (generated by cBioPortal).

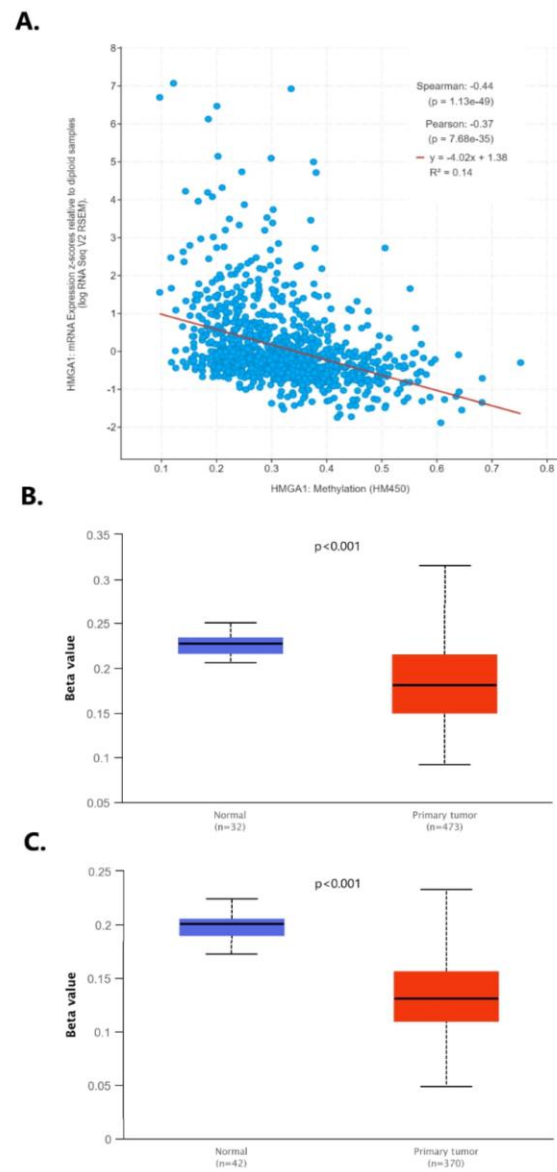


Figure 11. (A) Correlation between the mRNA expression level and DNA methylation profile of the *HMGAT1* in lung cancer by cBioPortal; the promoter methylation level of the *HMGAT1* in (B) lung adenocarcinoma and (C) lung squamous cell carcinoma tissue in comparison with normal lung tissue by UALCAN.

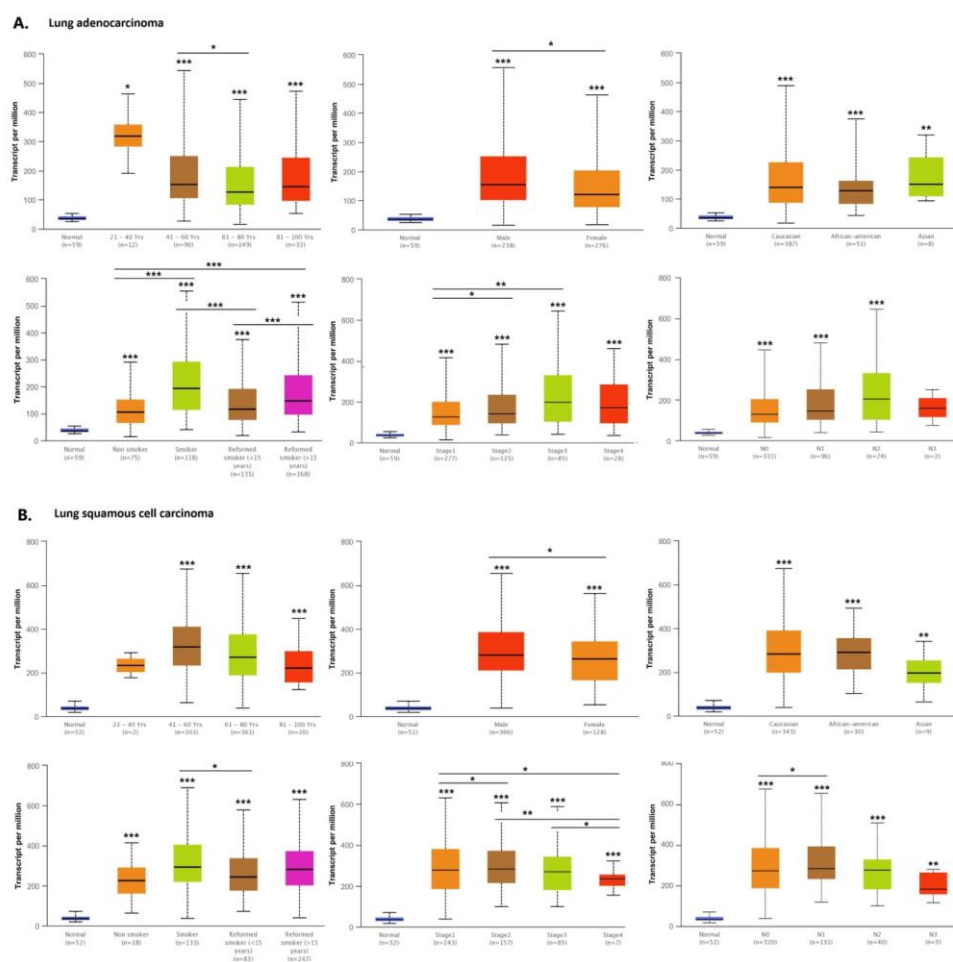


Figure 12. Association between the *HMGAI* expression level and selected clinical parameters: age, gender, population affinity, smoking status, TNM stage, and nodal involvement in healthy individuals and lung cancer patients. **(A)** lung adenocarcinoma patients. **(B)** lung squamous cell carcinoma patients (UALCAN); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; the first layer-* right above the error bar indicates comparison to the normal group, the above layers-* placed above a second line indicates the comparison between corresponding groups covered by the line.

In lung adenocarcinoma, a significantly higher expression level was found in lung adenocarcinoma patient groups aged between 41 and 60 years than 61–80 years ($p = 0.0335$). No differences were found between any two of the remaining age groups. The *HMGAI* expression level was not connected with the age of lung squamous cell carcinoma patients. The higher expression level of the gene was consistently higher in men than women in both lung adenocarcinoma ($p = 0.0393$) and lung squamous cell carcinoma ($p = 0.0177$).

Population affinity did not give rise to any significant differences in the *HMGA1* expression in any of the analyzed subtypes of lung cancer.

In both lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, the level of *HMGA1* expression was the lowest in non-smokers, of intermediate value in reformed smokers, and the highest in current smokers. In lung adenocarcinoma, statistically significant differences were stated between the non-smoker group and any of the groups of reformed smokers >15 years ($p = 0.0004$) and current smokers ($p = 0.0000$). There was also a difference in the level between reformed smokers for <15 years and any of the groups of reformed smokers for >15 years ($p = 0.0006$) and smokers ($p = 0.0000$). In squamous cell carcinoma, only smokers and reformed smokers for <15 year groups differed significantly in *HMGA1* expression level ($p = 0.0217$).

In lung adenocarcinoma, nodal status was not connected with the expression level of the *HMGA1*. In squamous cell carcinoma, higher expression was noted in the N1 group than in the N0 group ($p = 0.0232$); however, no significant differences were found between other subgroups of patients. In both analyzed subtypes of lung cancer, some dissimilarities in *HMGA1* expression level were stated. In lung adenocarcinoma, the level was significantly lower in stage I than in stages II ($p = 0.0227$) and III ($p = 0.0023$). In squamous cell carcinoma, the *HMGA1* expression level was lower in stage I than in stage II ($p = 0.0330$). Additionally, in this subtype of lung cancer, the expression level in stage IV was significantly lower than the level in the other three subgroups of different clinical stages: stage I ($p = 0.0314$), stage II ($p = 0.0314$), and stage III ($p = 0.0188$).

Additionally, the gene chip data provided by TNMplot indicated significant differences in *HMGA1* expression level between normal lung tissue and lung cancer tissue—primary and metastatic samples ($p = 0.0000$; Figure 13). The level was significantly lower in normal tissue than in tissues of both primary tumors ($p = 0.0000$) and metastases ($p = 0.0000$). It was also lower in primary tumors than in metastases ($p = 0.0000$).

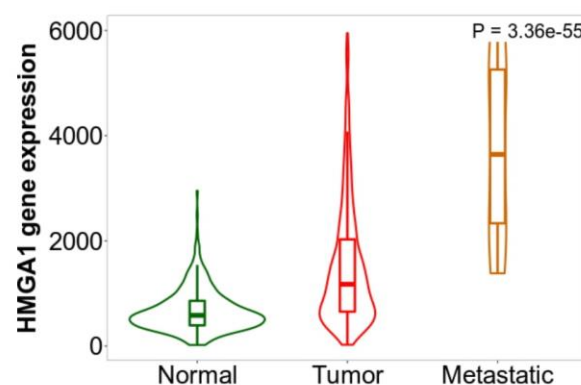


Figure 13. The *HMGA1* expression level in normal lung tissue and lung cancer tissue—primary and metastatic samples. Plot generated using TNMplot based on gene chip data.

2.6. High *HMGA1* Expression Is Related to a Poor Prognosis in Lung Cancer

To evaluate the association between the *HMGA1* expression level and the prognosis of lung cancer patients, a survival analysis was done using the Kaplan–Meier plotter. Lung cancer patients with high expression of the gene had a shorter overall ($p < 1 \times 10^{-16}$) and first progression ($p = 1.7 \times 10^{-6}$) survival time in comparison to the low expression group. As an association was found between the *HMGA1* expression level and some clinicopathological factors known to be determinants of patient survival, a survival analysis was performed restricted to subgroups of patients who differed with regard to sex, smoking history, grade, stage, and histological type (Table 1).

Table 1. Survival analysis of *HMGA1* expression regarding selected clinicopathological factors in lung cancer by Kaplan–Meier plotter.

Variable	Overall Survival			First Progression Survival		
	N	Hazard Ratio	p-Value	N	Hazard Ratio	p-Value
Non-restricted analysis	1925	1.78 (1.57–2.03)	$<1 \times 10^{-16}$	982	1.60 (1.32–1.94)	1.7×10^{-6}
Grade						
I	201	1.34 (0.93–1.92)	0.1101	140	1.21 (0.78–1.87)	0.4016
II	310	1.70 (1.24–2.34)	0.0009	165	1.33 (0.88–2.02)	0.1729
III	77	1.59 (0.82–3.07)	0.1676	51	0.68 (0.30–1.54)	0.3572
Histology						
adenocarcinoma	719	1.93 (1.52–2.45)	4.7×10^{-8}	461	1.79 (1.30–2.46)	0.0003
squamous cell carcinoma	524	1.15 (0.91–1.46)	0.2403	141	1.24 (0.74–2.07)	0.4168
Stage						
I	577	3.01 (2.24–4.05)	2.3×10^{-14}	325	1.48 (0.95–2.29)	0.0810
II	244	1.33 (0.92–1.92)	0.1239	130	0.91 (0.54–1.52)	0.7062
III	70	1.00 (0.57–1.74)	0.9962	19	NA	NA
IV	4	NA	NA	0	NA	NA
AJCC stage T						
1	437	1.66 (1.24–2.22)	0.0005	177	1.75 (1.04–2.93)	0.0318
2	589	1.33 (1.07–1.67)	0.0108	351	1.19 (0.88–1.60)	0.2636
3	81	1.15 (0.70–1.89)	0.5938	21	1.89 (0.71–5.07)	0.1968
4	46	1.47 (0.78–2.77)	0.2355	7	NA	NA
AJCC stage N						
0	781	1.39 (1.12–1.71)	0.0023	374	1.31 (0.95–1.81)	0.1046
1	252	1.38 (1.01–1.88)	0.0455	130	1.53 (0.97–2.42)	0.0640
2	111	1.23 (0.82–1.84)	0.3076	51	2.47 (1.20–5.08)	0.0110
0	781	1.39 (1.12–1.71)	0.0023	374	1.31 (0.95–1.81)	0.1046
AJCC stage M						
0	681	1.46 (1.18–1.79)	0.0004	195	1.35 (0.82–2.25)	0.2375
1	10	NA	NA	0	NA	NA
Sex						
female	714	2.08 (1.63–2.64)	1.1×10^{-9}	468	1.40 (1.05–1.86)	0.0218
male	1100	1.59 (1.36–1.87)	7.6×10^{-9}	514	1.61 (1.24–2.09)	0.0003
Smoking history						
never-smokers	205	2.20 (1.22–3.69)	0.0071	193	1.73 (1.06–2.82)	0.0255
present or reformed smokers	820	1.71 (1.38–2.11)	4.9×10^{-7}	603	1.53 (1.20–1.96)	0.0006

High *HMGA1* expression level was connected with poor overall and first progression survival in both sexes and both analyzed smoking history states. The association between *HMGA1* expression and overall and first progression survival was significant only in stage I but not in more advanced stages. Correspondingly, this connection was stated as significant in AJCC stage T 1 for overall and first progression survival, and AJCC stage T 2 for overall survival, but not in more advanced AJCC stages T. A high *HMGA1* expression level was associated with poor overall survival in AJCC stages N 0 and N1 and with first progression survival in AJCC stages N1 and N2. In AJCC stages M0, the high expression level of the gene was connected with shorter overall, but not first progression, survival.

A significant connection was observed between the *HMGA1* expression level and overall survival times in lung adenocarcinoma ($p = 4.7 \times 10^{-8}$), but not in the lung squamous cell carcinoma subtype ($p = 0.2403$; Figure 14A). The first progression survival analysis showed similar results (adenocarcinoma $p = 0.0003$, squamous cell carcinoma $p = 0.4168$, Figure 14B). To validate these findings, the survival data of NSCLC, lung adenocarcinoma, and lung squamous cell carcinoma patients provided by the PrognScan database was compared (Table 2). For adenocarcinoma, a connection between *HMGA1* expression level and overall survival was detected with Cox p -value < 0.1 in nine of fourteen different datasets, and between *HMGA1* expression and relapse-free survival in one of two datasets.

For squamous cell carcinoma, no association was found between *HMGA1* expression and neither overall nor relapse-free survival, based on the available six datasets.

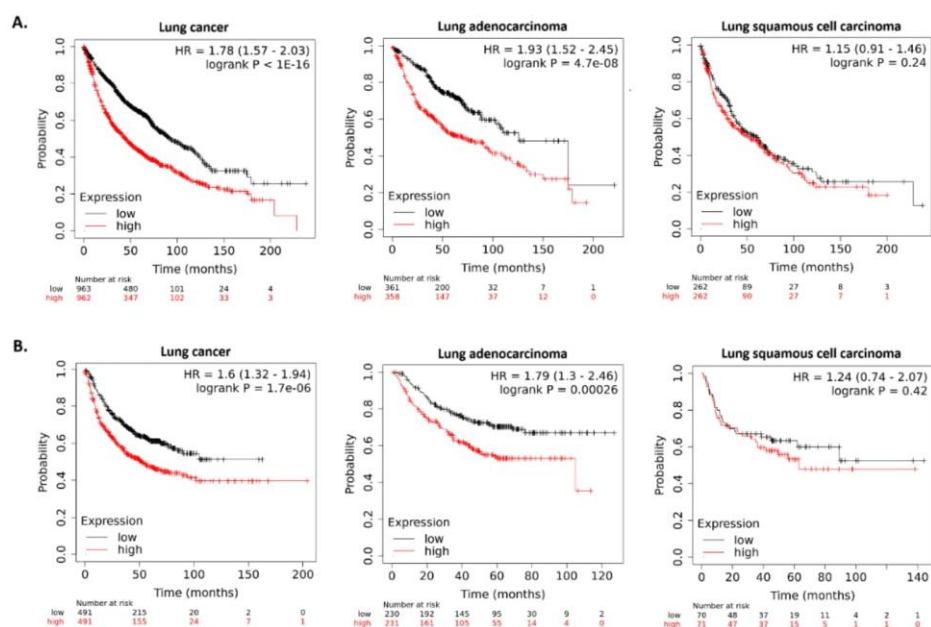


Figure 14. Kaplan–Meier survival curves based on *HMGA1* expression level by Kaplan–Meier plotter: (A) the overall survival for all lung cancer patients ($n = 1925$), lung adenocarcinoma patients ($n = 719$), and squamous cell lung carcinoma patients ($n = 524$); (B) the first progression survival for all lung cancer patients ($n = 982$), lung adenocarcinoma patients ($n = 461$), and squamous cell lung carcinoma patients ($n = 141$).

Table 2. *HMGA1* expression and survival data of lung cancer patients using the PrognScan database.

Dataset	Subtype	End-Point *	Probe ID	N	Cut-Point	Cox p-Value	HR [95% CI]
jacob-00182-CANDF	LUAD	OS	210457_x_at	82	0.32	0.1758	1.25 [0.90–1.73]
jacob-00182-CANDF	LUAD	OS	206074_s_at	82	0.48	0.0547	1.99 [0.99–4.03]
HARVARD-LC	LUAD	OS	39704_s_at	84	0.88	0.0073	1.67 [1.15–2.42]
jacob-00182-HLM	LUAD	OS	210457_x_at	79	0.80	0.5391	0.89 [0.60–1.30]
jacob-00182-HLM	LUAD	OS	206074_s_at	79	0.23	0.9811	1.00 [0.67–1.51]
MICHIGAN-LC	LUAD	OS	L17131_ma1_at	86	0.20	0.0998	1.48 [0.93–2.35]
jacob-00182-MSK	LUAD	OS	206074_s_at	104	0.81	0.0235	1.83 [1.08–3.08]
jacob-00182-MSK	LUAD	OS	210457_x_at	104	0.83	0.0138	1.62 [1.10–2.37]

Table 2. Cont.

Dataset	Subtype	End-Point *	Probe ID	N	Cut-Point	Cox p-Value	HR [95% CI]
GSE13213	LUAD	OS	A_23_P42331	117	0.11	0.0606	0.34 [0.11–1.05]
GSE13213	LUAD	OS	A_24_P222043	117	0.81	0.0151	1.35 [1.06–1.73]
GSE31210	LUAD	OS	210457_x_at	204	0.68	0.1824	0.74 [0.48–1.15]
GSE31210	LUAD	OS	206074_s_at	204	0.61	0.0056	2.01 [1.23–3.29]
jacob-00182-UM	LUAD	OS	210457_x_at	178	0.60	0.6309	1.06 [0.83–1.35]
jacob-00182-UM	LUAD	OS	206074_s_at	178	0.66	0.0627	1.39 [0.98–1.96]
GSE31210	LUAD	RFS	210457_x_at	204	0.35	0.5440	0.90 [0.63–1.27]
GSE31210	LUAD	RFS	206074_s_at	204	0.78	0.0000	2.34 [1.62–3.37]
GSE4573	LUSC	OS	206074_s_at	129	0.37	0.1601	1.45 [0.86–2.45]
GSE4573	LUSC	OS	210457_x_at	129	0.20	0.4697	1.13 [0.81–1.59]
GSE17710	LUSC	OS	32619	56	0.84	0.8742	1.06 [0.53–2.09]
GSE17710	LUSC	OS	29455	56	0.73	0.6085	0.80 [0.35–1.85]
GSE17710	LUSC	OS	39302	56	0.55	0.6607	1.10 [0.72–1.66]
GSE17710	LUSC	RFS	39302	56	0.55	0.6389	1.10 [0.74–1.64]
GSE17710	LUSC	RFS	32619	56	0.79	0.8784	0.95 [0.48–1.89]
GSE17710	LUSC	RFS	29455	56	0.11	0.6048	0.82 [0.38–1.77]

* OS—overall survival, DSS—disease-specific survival, RFS—relapse-free survival.

2.7. HMGA1 Protein Interacts with Proteins Involved in Cellular Senescence and Ageing, Cell Cycle Control, Transcription Regulation, Chromatin Assembly/Remodelling, and Cholesterol and Isoprene Biosynthesis

Lastly, to understand the importance of HMGA1 for the carcinogen process, the study examined the proteins that interact with HMGA1 and the related cellular processes. An HMGA1-centered protein–protein network was constructed using the STRING online tool. Interactors predicted with a confidence score of at least 0.700 are presented in Figure 15. The top functional partners of the HMGA1 protein, predicted with the highest confidence, were cellular tumor antigen p53 (TP53, score = 0.986), lamin-B1 (LMNB1, score = 0.923), retinoblastoma-associated protein (RB1, score = 0.915), ribosomal protein S6 kinase beta-1 (RPS6KB1, score = 0.904), and E1A-binding protein p400 (EP400, score = 0.900).

Clustering of the generated PPI network revealed three clusters of interacting proteins (Figure 16). Functional enrichment analysis against gene ontology found the network to be mostly enriched in cellular senescence and cell ageing, cell cycle control, transcription regulation, chromatin assembly and remodeling, cholesterol and isoprene biosynthesis for biological processes, and significantly enriched in chromatin and nucleoplasm for cellular components.

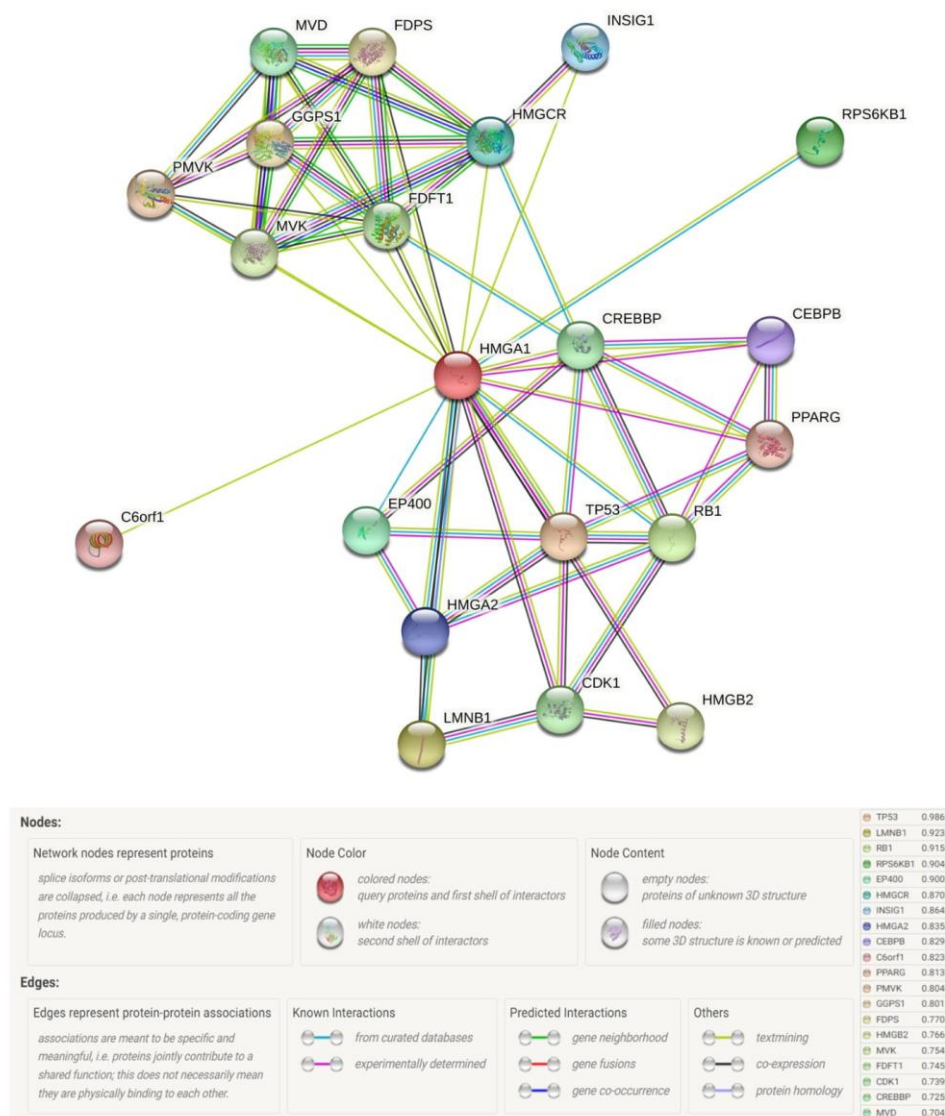


Figure 15. The protein interaction network of the HMGA1 gained from the STRING database.

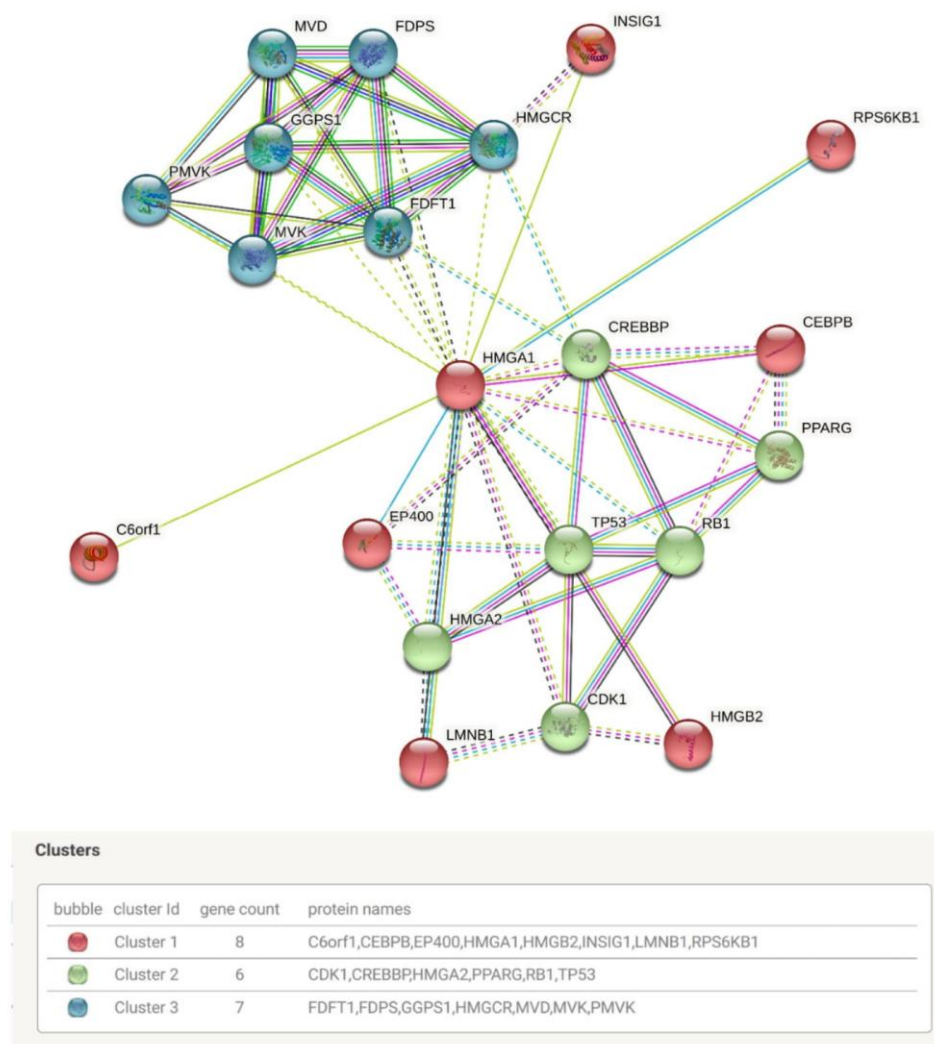


Figure 16. Clustered protein-protein interaction network of the HMGA1. Edges of clusters were indicated by dotted lines.

TCGA and TGEx data provided by the GEPIA platform was used to analyze the correlation between *HMGA1* expression level and those of genes coding revealed protein interactors in lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, and normal lung cancer tissue (Table 3). The strongest positive correlation was found for *CDK1* ($R_S = 0.61$) and *LMNB1* ($R_S = 0.54$) in lung adenocarcinoma. The expression levels of *EP400*, *HMGB2*, *CDK1*, *PPARG*, and *MVK* were found to be significantly correlated with *HMGA1* expression level in both analyzed cancer subtypes but not in non-cancerous tissue of the lung. Expression

levels of the *GGPS1* and *PMVK* genes were only significantly correlated with *HMGA1* expression in lung adenocarcinoma.

Table 3. Correlation between expression levels of the *HMGA1* and the genes coding putative interacting proteins in lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, and normal lung tissue. Calculated by GEPIA.

	Lung Adenocarcinoma		Lung Squamous Cell Carcinoma		Normal Lung Tissue	
	R Spearman	p-Value	R Spearman	p-Value	R Spearman	p-Value
<i>C6orf1</i>	0.02	0.72	0.21	3.30×10^{-6}	0.21	0.00027
<i>CEBPB</i>	0.17	1.8×10^{-4}	−0.21	2.4×10^{-6}	0.27	3.9×10^{-6}
<i>EP400</i>	0.21	2.2×10^{-6}	0.26	3.10×10^{-9}	−0.09	0.13
<i>HMGB2</i>	0.39	1.10×10^{-18}	0.25	4.20×10^{-8}	−0.06	0.33
<i>LMNB1</i>	0.54	8.70×10^{-38}	0.38	6.10×10^{-18}	0.43	2.10×10^{-14}
<i>RPS6KB1</i>	0.31	3.90×10^{-12}	0.26	8.90×10^{-9}	0.10	0.081
<i>CDK1</i>	0.61	3.00×10^{-50}	0.27	2.80×10^{-9}	0.06	0.35
<i>CREBBP</i>	0.08	0.073	0.18	5.00×10^{-5}	−0.27	3.30×10^{-6}
<i>HMGA2</i>	0.31	2.00×10^{-12}	0.24	8.70×10^{-8}	0.18	0.002
<i>PPARG</i>	0.20	6.00×10^{-6}	0.15	8.00×10^{-4}	−0.02	0.062
<i>RB1</i>	0.03	0.54	−0.04	0.41	−0.07	0.25
<i>TP53</i>	0.01	0.77	0.18	6.90×10^{-4}	0.08	0.19
<i>INSIG1</i>	0.12	9.40×10^{-3}	0.13	5.20×10^{-3}	0.29	8.2×10^{-7}
<i>FDFT1</i>	0.01	0.81	0.22	5.60×10^{-7}	0.28	1.40×10^{-6}
<i>FDPS</i>	0.30	1.30×10^{-11}	0.25	2.90×10^{-8}	0.2	5.00×10^{-4}
<i>GGPS1</i>	0.10	0.029	0.04	0.44	−0.01	0.9
<i>HMGCR</i>	0.23	2.00×10^{-7}	0.22	1.50×10^{-6}	0.25	2.10×10^{-5}
<i>MVD</i>	0.19	2.60×10^{-5}	0.18	7.20×10^{-5}	0.37	5.00×10^{-11}
<i>MVK</i>	0.12	0.0083	0.19	1.50×10^{-5}	−0.01	0.88
<i>PMVK</i>	−0.09	0.042	0.00	0.98	−0.01	0.9

3. Discussion

In 1983, Lund et al. [17] discovered *HMGA1* expression in cervical cancer HeLa S3 cells. Since then, an elevated expression of the protein or *HMGA1* gene has been confirmed in many cancers of epithelial and mesenchymal origin, e.g., breast cancer [18], gastric cancer [19], lung cancer [20], or glioblastoma [21]. The present study used big data to screen for *HMGA1* expression levels in various types of cancers. Its findings largely support the previously published observation that *HMGA1* overexpression is a common feature of cancers, even those with distinct tissue origins: tumors of the head and neck, breast, gastrointestinal, and reproductive system, as well as melanoma and lymphomas, demonstrated elevated *HMGA1* expression in comparison to non-cancerous tissue, followed by an increase in *HMGA1* protein. Surprisingly, a few exceptions were also noted; for example, in kidney chromophobe and renal clear cell carcinoma, the *HMGA1* was underexpressed. This suggests the presence of distinct gene expression regulation mechanisms in these types of cancer. Indeed, tissue-specific upstream and downstream regulation of *HMGA1* was described in head and neck, thoracic, reproductive system cancer, and other abdominal tumors [8]. Taken together, the deregulation of *HMGA1* expression appears to be a hallmark of cancer and implies that *HMGA1* plays an essential role in carcinogenesis. but the mechanisms in which the expression is changed during carcinogenesis remain unclear.

Earlier research showed higher expression of the *HMGA1* gene in lung tumors than in the normal lung tissue [10–12]. Our present reanalysis using currently available data by OncoPrint and TNMplot found that *HMGA1* is overexpressed in lung cancer in comparison to unpaired normal lung tissue and to the non-cancerous tissue adjacent to the tumor. The

data published so far cannot conclusively indicate that *HMGA1* expression differs between different histological subtypes of lung cancer. Upregulation of *HMGA1* gene expression has been reported in both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of NSCLC [20], and *HMGA1* protein was detected in a high proportion of lung cancer tumors irrespective of the histological type [13]. No major differences in *HMGA1* gene or protein expression were reported between different NSCLC subtypes by Zhang et al. [14] and Zhang et al. [15]. However, Lin and Peng [16] detected higher levels of *HMGA1* protein in the squamous cell carcinoma subtype compared to adenocarcinoma. Our present analysis of the various large datasets provided by Oncomine showed that *HMGA1* upregulation is a common phenomenon, concerning not only adenocarcinoma and squamous cell carcinoma but also large and small cell carcinomas of the lung. In addition, the *HMGA1* expression level was positively correlated with *HMGA1* protein abundance in both lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. Most likely, re-expression of the *HMGA1* gene occurs at the early stages of carcinogenesis in the lung and increases as the process progresses. *HMGA1* protein has been found to be present in increased amounts in metaplasia, dysplasia, and carcinoma in situ of the bronchial epithelium [13]. These findings raise the question of whether *HMGA1* could be useful in distinguishing between normal and neoplastic lung tissue. For example, early research demonstrated that *HMGA1* expression could be useful in differentiating between thyroid follicular carcinoma and adenoma [22]. Our TMNplot analysis indicates that the *HMGA1* expression level could discriminate with good sensitivity and specificity between cancerous and adjacent non-cancerous tissues in both lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Thus, it could be concluded that the *HMGA1* expression level could be a lung cancer biomarker.

With *HMGA1* overexpression being a common feature of lung cancer, the study then examined the molecular mechanisms responsible for its upregulation. Further research showed that growth factors, cancer-associated mutations (*KRAS*, mutated *APC*), or cancer-related transcription factors (*cMYC*) could up-regulate *HMGA1* in specific contexts [23]. Little is known about the role of *HMGA1* mutations in determining the function and expression level of the *HMGA1* in cancer. In invasive triple-negative breast cancer cells, mutating the three *HMGA1* serines (99, 102, and 103) phosphorylated by casein kinase 2 (*CK2*) results in decreased *HMGA1* secretion and disrupts the invasive properties of the cell line [24]. Mutation of serine 102 of *HMGA1*, a *CK2* phosphorylation site, was found to restore the efficacy of gefitinib through the reactivation of the downstream signaling pathway of *EGFR* in drug-resistant NSCLC cells [25].

Our own analysis of the data provided by cBioPortal found that the genomic alterations of the *HMGA1* gene occur very rarely in lung cancer tissue. Collective frequency of gene amplification, gene deletion, and point mutation slightly exceeded 1% of 7276 analyzed lung cancer cases and the detected alterations were restricted to adenocarcinoma and squamous cell carcinoma subtypes. This is in agreement with Klett et al. [26], who showed that *HMGA1* was among the top 5% of more than 19,000 genes, with the lowest mutation frequency analyzed in more than 9000 cancerous samples from TCGA. As could be expected, a positive correlation was found between *HMGA1* expression level and the copy number of the gene. However, the low occurrence of *HMGA1* amplification or point mutation in lung cancer excludes the possibility that genomic alterations of *HMGA1* are responsible for the common overexpression of *HMGA1* in this type of tumor. In contrast, a negative correlation was found between the mRNA expression level and the DNA methylation profile of *HMGA1* in lung cancer.

TCGA data provided by the UALCAN platform indicated that the *HMGA1* promoter methylation level was significantly decreased in both lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma tissue in comparison with normal lung tissue. Another study based on TCGA data by Klett et al. [26] demonstrated that hypomethylation of 9 from 21 analyzed CpGs in *HMGA1* was an indicator of increased gene expression in breast cancer, lung adenocarcinoma, and thyroid cancer. *HMGA*, as one of the pluripotency-related genes, acquired 5-methylcytosines in their promoters, which were repressed during

differentiation of human embryonic stem (hES) cells into ventral midbrain-type neural precursor cells and then into dopamine neurons. Promoter methylation was preserved to maintain a silencing state [27]. It also was shown that *HMGA1* was suppressed in hepatocellular carcinoma cells by human menstrual-blood-derived stem cells via amending 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine abundance at its regulatory region [28]. Considering the above, the *HMGA1* gene may be a potential candidate for DNA methylation targeting anti-cancer therapy.

Our findings indicate some connection between *HMGA1* expression and the sex and smoking history of lung cancer patients. While Lin and Peng [16] report that tissue *HMGA1* expression was more frequently observed in men than women, this was contradicted by Zhang et al. [14] and Zhang et al. [15]. In our study, the *HMGA1* expression level was consistently higher among men in both lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. The gender-specific biological and clinical features of lung cancer have been described previously [29,30], suggesting that lung cancer in women and men are distinct entities, mainly because of the involvement of genetic alterations and hormonal factors. Rouquetta et al. [3] observed a higher rate of *EGFR* mutations in women. ER and EGFR were also expressed more frequently in women and there was a positive link between the expression of EGFR and of ER. As *HMGA1* is an upstream negative regulator of the EGFR signaling pathway [25], it could be speculated that gender-specific *HMGA1* expression influences lung cancer cell behavior.

Among NSCLC patients, ever-smokers demonstrate higher overall mortality than never-smokers, and current smoking is an independent risk factor for a poorer prognosis [31]. Our present data suggests some differences in *HMGA1* expression levels related to smoking status. Generally, the level of *HMGA1* expression tends to be the lowest in non-smokers, of intermediate value in reformed smokers, and the highest in current smokers in both lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. However, in the lung adenocarcinoma group, statistically significant differences were noted between the non-smoker group and both reformed smokers >15 years and current smokers. Jung et al. [32] compared TCGA data for the smoker's lung adenocarcinoma and normal lung tissue; the analysis found that *HMGA1* is one of six genes up-regulated in LUAD, and simultaneously inversely correlated with DNA methylation level. Borderline differences in CpG methylation of *HMGA1* have been noted between smoking and never-smoking lung adenocarcinoma patients based on validation of clinical samples. Since cigarette smoke affects DNA methylation and thus is a critical factor in the development of lung cancer [33,34], it may, at least partially, account for the observed differences in *HMGA1* expression levels associated with smoking habits.

The significant role played by *HMGA1* expression in promoting growth, invasiveness, and migration of lung cancer cells in vitro has been confirmed [11,35]. Similarly, in the present study, *HMGA1* expression level was found to increase from non-tumor lung tissue through lung primary tumor to lung cancer metastasis. Zhang et al. [14] and Zhang et al. [15] report that high *HMGA1* protein expression in NSCLC tissue was associated with tumor size, the presence of lymph node and distant metastases, and with higher advancement according to the TNM classification. Although differences were noted in the expression level between patients of different nodal statuses and stages of the disease in the present study, the observed differences were restricted to one histological subtype of lung cancer or to particular states of the analyzed factor. A connection was observed between *HMGA1* expression level and nodal status in lung squamous cell carcinoma but not in lung adenocarcinoma, and the only significant difference in level was observed between N0 and N1 cases. An increase in the median *HMGA1* expression level was stated between stage I and stages II and III in adenocarcinoma, and between stages I and II in squamous cell carcinoma. Contrary to expectations, no further increase in the median level was detected in the most advanced IV stage, probably because of the relatively low number of cases in this stage.

Zhang et al. [14] found high *HMGA1* protein expression to be associated with a shorter survival time and was stated as an independent negative prognostic factor in

NSCLC patients. No such correlation was observed by Lin and Peng [16]. In the present study, survival analysis indicates the high *HMGAI* expression level is connected with poor survival of lung cancer patients. Overall and first progression survival of lung cancer patients was shorter when *HMGAI* expression was high, according to the Kaplan–Meier plotter. However, survival analysis in the context of clinicopathological factors suggests that the association between *HMGAI* expression and survival rate may be limited to specific subgroups of patients. For example, a high expression level of the *HMGAI* gene was connected to an increased risk of death in stage I patients but not in stage I or II. Similarly, the mentioned connection was detected in the adenocarcinoma subtype but not in squamous cell carcinoma of the lung. This is in line with the early findings of Sarhadi et al. [13], who report a correlation between the nuclear expression of the *HMGAI* protein and shorter survival time among patients with lung adenocarcinoma but not squamous cell carcinoma. It is most likely that the effect of the *HMGAI* on the progression of lung cancer is dependent on some other factors. For instance, Zhang et al. [15] stated the increased amount of *HMGAI* protein found in NSCLC tissue was connected with shorter overall survival compared to patients with a low amount of *HMGAI*. However, the amount of *HMGAI* protein in cancer tissue was correlated with the amount of *FOXMI* and *G6PD*. The proteins form a common pathway of transcriptional regulation with *HMGAI* and were similarly associated with TNM stage and overall survival.

To identify molecular contributors of *HMGAI* that could mediate or assist its function during carcinogenesis in lung tissue, a functional network was created. *HMGAI* was found to cooperate with proteins that can be grouped into three functional clusters. The first cluster was mostly enriched by protein involved in transcriptional regulation and chromatin assembly and remodeling (*C6orf1*, *CEBPB*, *EP400*, *HMGB2*, *LMNB1*, and *RPS6KB1*). For most of these proteins, there is some evidence that they are concerned with neoplastic transformation in the lung. Ribosomal proteins S6 kinase B1 (*RPS6KB1*, p70S6K) are critical components of mTOR signaling, that have been found to increase the growth of NSCLC cells in vivo and inhibit tumor metastasis through repression of epithelial-mesenchymal transition [36]. The AMPK-*CEBPB*-*PDL1* signaling pathway enhances the proliferation of NSCLC cells [37]. *Lamin B1* is overexpressed in lung adenocarcinoma cells and promotes the proliferation of lung cancer cells via the *AKT* pathway [38]. *p400* is an important mediator of downregulation of *EGFR* and apoptosis induced by *E1A* protein of human adenovirus [39]. By sharing a functional connection with the mentioned protein, *HMGAI* could be involved in the most important signaling pathways driving lung carcinogenesis. Additionally, we found the expression level of *HMGAI* to be positively correlated with the expression of *HMGB2* and *EP400* genes in both lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma but not in normal lung tissue, which could suggest that co-expression of these genes may be crucial for malignant transformation.

Functional enrichment analysis indicated that the second cluster within the built PPI network is an assembly of proteins involved in cellular senescence and cell cycle control (*TP53*, *RB1*, *CDK1*, *CREBBP*, *PPARG*, and *HMGAI*). Previously, bioinformatics analyses conducted by Zhou et al. [40] found *TP53* and *HMGAI* to be two of the main 10 genes belonging to the miRNA-gene interaction network, and may be crucial in the pathogenesis of NSCLC. However, the proteins are also believed to be engaged in other cellular processes essential for lung neoplastic transformation, such as cell adhesion, invasion and migration. For example, *CDK1* positively regulated the stemness of lung cancer cells [41] and mediated the signaling for proliferation, invasion, and migration in NSCLC cells [42]. Loss of *CREBBP* drives tumorigenesis in SCLC by reducing histone acetylation and transcription of cellular adhesion genes [43]. Activation of *PPARG* expression may inhibit the progression of LSCC through the regulation of LSCC upstream regulators and downstream marker genes involved in tumor cell proliferation and protein polyubiquitination/ubiquitination [44]. Additionally, CREB binding protein (*CREBBP*) directly influences the *HMGAI* function. Munshi et al. [45] demonstrated *CREBBP* acetylate *HMG(I)Y* modulating IFN- β transcriptional regulation. Our present findings indicate that the *HMGAI* gene expression

level correlated with expression of both *CDK1* and *PPARG* in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma but not in normal lung tissue; this supports the findings that the interaction the *HMGA1* with these *CDK1* and *PPARG* are important for lung carcinogenesis.

Proteins involved in cholesterol, mevalonate, and isoprene biosynthesis (*FDF1*, *FDPS*, *GGPS1*, *HMGCR*, *MVD*, *MVK*, *PMVK*, and *INSIG1*) were revealed to be *HMGA1* interactors. An association between *HMGA1* and adipogenesis has been described earlier. *HMGA1* has been found to play an essential role in adipocytic cell growth and differentiation in murine 3T3-L1 adipocytes [46]. Reduced fat mass and impaired adipogenesis were demonstrated in transgenic mice overexpressing *HMGA1* in both white and brown adipose tissues compared to wild-type mice [47]. In humans, the *HMGA1* IVS5-13insC variant (rs146052672), which resulted in a decrease in mRNA and protein levels of *HMGA1*, was significantly associated with metabolic syndrome and negatively correlated with serum HDL-cholesterol [48,49]. The variant was also connected with the elevated risk of acute myocardial infarction independently of diabetes mellitus type 2 and other classic cardiovascular risk factors like gender, hypertension, and obesity [50]. There is some evidence that the relationship between the *HMGA1* and cholesterol biosynthesis may be significant in neoplastic transformation. Our findings indicate that the *MVK*, *GGPS1* and *PMVK* expression was correlated with *HMGA1* gene expression in lung cancer tissues, but not in normal lung tissue. Previously, Treff et al. [51] demonstrated that cholesterol biosynthesis genes are decreased in human MCF-7 mammary adenocarcinoma cells with *HMGA1a*-induced overexpression. Simultaneously, total cholesterol was significantly depleted and sensitivity to epidermal growth factor activation of ERK phosphorylation was significantly elevated in cells overexpressing *HMGA1a*.

Taken together, the findings from the bioinformatical analysis indicate that elevated *HMGA1* expression is a common feature of many malignant tumors, including lung cancer. *HMGA1* overexpression in lung cancer could result from reduced *HMGA1* methylation and this is connected with some clinicopathological features and adverse prognosis of lung cancer patients. *HMGA1* could be an essential element of lung carcinogenesis through the interaction with proteins involved in e.g., cell cycle control, transcription regulation, and cholesterol and isoprene biosynthesis. Considering the carcinogenic properties of *HMGA1* and its connection with poor prognosis in many types of cancer, some approaches were previously made to invent an in vitro diagnostic kit to quantitatively determine the amount of *HMGA1b* in peripheral blood of cancer patients [52]. In light of the results of our analysis, the evaluation of *HMGA1* expression level may be of great value in the management of lung cancer patients. Especially, the possibility to identify very little amounts of *HMGA1* transcripts directly in the blood specimens could either allow for early diagnosis or the monitoring of the efficacy of lung cancer therapy. Moreover, *HMGA1* protein-targeted therapies based on aptamers or antisense RNA, as well as *HMGA1* gene inhibitors, were developed to slow down the proliferation of cancer cells or to increase their sensitivity to chemotherapy [9]. High expression levels of *HMGA1* mRNA in lung tumors and relatively low expression levels in non-cancerous tissue of the lung allow us to assume that such therapies would have clinical advantages in lung cancer because of presumed low toxicity toward healthy cells.

4. Materials and Methods

4.1. Gene Expression Analysis

4.1.1. OncoPrint

The OncoPrint database [53] (<https://www.oncoPrint.org>, accessed on 1 January 2022) was used: (1) to analyze the *HMGA1* mRNA expression level in a variety of human cancers, where threshold settings were as follows: gene ranking of the top 10%, change ≥ 2 , p -value $\leq 1 \times 10^{-4}$, and (2) to screen *HMGA1* mRNA expression level in different histological subtypes of lung cancer. All statistical methods and statistical values were obtained directly from the mentioned database.

4.1.2. TIMER2.0

The Gene_DE module of the Tumor Immune Estimation Resource 2.0 [54] (<http://timer.cistrome.org>, accessed on 1 January 2022) was used to study the differential expression between tumor and adjacent normal tissues for *HMGA1* gene across TCGA tumors. The distributions of gene expression levels are displayed using box plots. The statistical significance (*p*-value) was computed by the Wilcoxon test.

4.1.3. TMNplot

The TMNplot web tool [55] (<https://tmnplot.com>, accessed on 1 January 2022) was used: (1) to display pan-cancer changes in *HMGA1* expression based on RNA-seq data from TCGA, genotype-tissue expression (GTEx), therapeutically applicable research to generate effective treatment (TARGET); significant differences are typed red and marked with an asterisk, (2) to compare *HMGA1* expression level in lung cancer and non-tumor lung tissues based on RNA-seq and DNA chip data. The normal and tumor samples were compared by the Mann–Whitney U-test, matched tissues with adjacent samples were compared using the Wilcoxon test. Normal, tumorous, and metastatic tissue gene comparison was analyzed using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s test.

4.2. Prognosis and Survival Analysis

4.2.1. Ualcan

TCGA data available on the UALCAN portal [56] (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>, accessed on 1 January 2022) was used to validate the association between *HMGA1* expression level with selected clinical features in the lung adenocarcinoma and lung squamous carcinoma. The results were presented in box-whisker plots with minimum, q1, median, q3, and maximum values. The significance of the difference was estimated by Student’s *t*-test considering unequal variance.

4.2.2. Kaplan–Meier Plotter

The Kaplan–Meier plotter [57] (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>, accessed on 1 January 2022) was applied to evaluate the prognostic value of *HMGA1* expression level for overall survival and first progression survival in lung cancer, lung adenocarcinoma, and lung squamous cell carcinoma. Kaplan–Meier plots were drawn using “*HMGA1*” as an input query, array quality control was set as “exclude biased arrays”; patients were split by median; the desired Affy ID 206074_s_at was valid.

4.2.3. Prognoscan

The Prognoscan [58] (<http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/Prognoscan/index.html>, accessed on 1 January 2022) was used to evaluate the connection between *HMGA1* expression level and overall and relapse-free survival in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. Cox *p*-values and hazard ratio with a 95% confidence interval were calculated according to *HMGA1* mRNA level (high vs. low).

4.3. DNA Alteration and Methylation of the *HMGA1* Gene

4.3.1. cBioPortal

The genomic characteristics of *HMGA1* in lung cancers were analyzed using the cBioPortal for Cancer Genomics [59] (v3.7.28; <http://www.cbioportal.org>, accessed on 1 January 2022). Combined querying of 7276 patients/7799 samples from 27 studies was performed. The incidence of different alterations of the studied gene was assessed in lung cancer cases and, specifically, in NSCLC histological types. Additionally, the association between *HMGA1* mRNA expression level and copy number alteration, and between the mRNA level of the gene and methylation beta-value (HM450, 492 cases), was analyzed. Spearman’s and Pearson’s correlation coefficients were calculated.

4.3.2. OncoPrint

The OncoPrint database [53] (<https://www.oncoPrint.org>, accessed on 1 January 2022) was used to extract and analyze data about the copy-number alteration of the *HMGAI* in different histological subtypes of lung cancer.

4.3.3. UALCAN

TCGA data available on the UALCAN portal [56] (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>, accessed on 1 January 2022) was used to compare the promoter methylation level in the lung adenocarcinoma and lung squamous carcinoma and healthy lung tissue. The boxplot represents beta values of CpG probes located up to 1500 bp upstream of the gene's start site. The beta value is the ratio of the methylated probe intensity to the sum of methylated and unmethylated probe intensity. The beta value ranges from 0 to 1.

4.4. Protein Analysis

cBioPortal

Association between mRNA expression level vs. protein amount was assessed with the cBioPortal for Cancer Genomics [59] (v3.7.28; <http://www.cbioportal.org>, accessed on 1 January 2022). Separate analysis for lung adenocarcinoma (querying 4159 patients/4309 samples from 12 studies) and lung squamous cell carcinoma (querying 1256 patients/samples from 4 studies) were conducted. Spearman's and Pearson's correlation coefficients were calculated.

4.5. Interaction Network Analysis

4.5.1. STRING

The STRING database [60] (<https://string-db.org/>, accessed on 1 January 2022) was used to build a protein–protein interaction (PPI) network querying the protein “HMGAI” and organism “Homo sapiens”. The main parameters were set as follows: the minimum required interaction score was 0.7 and no more than 50 interactors to show. K-means clustering of the generated PPI network was performed with a pre-set of three clusters.

4.5.2. GEPIA

Correlation between *HMGAI* expression level and expression level of the selected genes was evaluated in TCGA and TCGEx data provided by gene expression profiling interactive analysis (GEPIA) [61] (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>, accessed on 1 January 2022). Spearman's correlation coefficient and *p*-values were calculated for each correlation.

4.6. Statistical Analysis

Computing the appropriate statistics was provided by data platforms utilized in the present study. In the OncoPrint database, Student's *t*-test was used to analyze the differential expression. The statistical significance was computed in the TIMER database by the Wilcoxon test. In the TNM plot database, to assess the significance of the expression level differences, the Mann–Whitney *U* test was used when two subgroups of samples were compared. Meanwhile, the Kruskal–Wallis test, followed by the Dunn post hoc test, was applied for analyzing the two-class differential expression analysis. When differences in expression levels with respect to clinical parameters were analyzed by the UALCAN, *t*-test assuming the unequal variance was calculated. Spearman and/or Pearson correlation coefficients were estimated for analysis of gene–gene expression level by the GEPIA, gene-to-protein expression level, gene expression-to-copy number value, and gene expression-to-methylation profile by the cBioPortal. To compare survival curves, the log rank test and hazard ratio (HR) with a 95% confidence interval (CI) were calculated. A univariate Cox regression model was applied to calculate the HR and Cox *p* value in the Prognoscan. In all above-mentioned analyses *p* < 0.05 was assumed to be significant.

Author Contributions: Conceptualization, L.S. and A.S.-K.; investigation, L.S.; writing—original draft preparation, L.S. and A.S.-K.; writing—review and editing, A.S.-K., A.J. and M.M.; supervision, A.S.-K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Medical University of Lodz, grant number 503/3-015-02/503-31-001-19-00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Links to publicly archived datasets analyzed: <https://www.oncomine.org>, <http://timer.cistrome.org>, <https://tnmplot.com>, <http://ualcan.path.uab.edu/index.html>, <http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>, <http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/PrognScan/index.html>, <http://www.cbioportal.org>, <https://string-db.org/>, and <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>, accessed on 1 January 2022.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. The Global Cancer Observatory; International Agency for Research on Cancer; W.H.O. Lung Cancer-Fact Sheet. 2020. Available online: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf> (accessed on 1 May 2022).
2. Thandra, K.C.; Barsouk, A.; Saginala, K.; Aluru, J.S.; Barsouk, A. Epidemiology of lung cancer. *Contemp. Oncol.* **2021**, *25*, 45–52.
3. Pinton, G.; Manzotti, B.; Balzano, C.; Moro, L. Expression and clinical implications of estrogen receptors in thoracic malignancies: A narrative review. *J. Thorac. Dis.* **2021**, *13*, 1851–1863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sumter, T.; Xian, L.; Huso, T.; Koo, M.; Chang, Y.-T.; Almasri, T.; Chia, L.; Inglis, C.; Reid, D.; Resar, L. The high mobility group A1 (HMGA1) transcriptome in cancer and development. *Curr. Mol. Med.* **2016**, *16*, 353–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Benecke, A.G.; Eilebrecht, S. RNA-mediated regulation of HMGA1 function. *Biomolecules* **2015**, *5*, 943–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vignali, R.; Marracci, S. HMGA genes and proteins in development and evolution. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 654. [[CrossRef](#)]
7. Pallante, P.; Sepe, R.; Puca, F.; Fusco, A. High mobility group A proteins as tumor markers. *Front. Med.* **2015**, *2*, 15. [[CrossRef](#)]
8. Wang, Y.; Hu, L.; Zheng, Y.; Guo, L. HMGA1 in cancer: Cancer classification by location. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 2293–2302. [[CrossRef](#)]
9. Fusco, A.; Esposito, F. HMGA and cancer: A review on patent literatures. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2019**, *14*, 258–267. [[CrossRef](#)]
10. Hillion, J.; Wood, L.J.; Mukherjee, M.; Bhattacharya, R.; Di Cello, F.; Kowalski, J.; Elbahloul, O.; Segal, J.; Poirier, J.; Rudin, C.M.; et al. Upregulation of MMP-2 by HMGA1 promotes transformation in undifferentiated, large-cell lung cancer. *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7*, 1803–1812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Ma, Y.; Li, X.-N.; Chen, S.; Du, B.-L.; Li, Y.-M. MicroRNA-4458 suppresses migration and epithelial–mesenchymal transition via targeting HMGA1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 637–649. [[CrossRef](#)]
12. Barh, D.; Jain, N.; Tiwari, S.; Field, J.K.; Padin-Iruegas, E.; Ruibal, A.; López, R.; Herranz, M.; Bhattacharya, A.; Juneja, L.; et al. A novel in silico reverse-transcriptomics-based identification and blood-based validation of a panel of sub-type specific biomarkers in lung cancer. *BMC Genom.* **2013**, *14*, S5. [[CrossRef](#)]
13. Sarhadi, V.K.; Wikman, H.; Salmenkivi, K.; Kuosma, E.; Sioris, T.; Salo, J.; Karjalainen, A.; Knuutila, S.; Anttila, S. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J. Pathol.* **2006**, *209*, 206–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhang, Z.; Wang, Q.; Chen, F.; Liu, J. Elevated expression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol.* **2014**, *36*, 1213–1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhang, R.; Tao, F.; Ruan, S.; Hu, M.; Hu, Y.; Fang, Z.; Mei, L.; Gong, C. The TGFβ1-FOXM1-HMGA1-TGFβ1 positive feedback loop increases the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by inducing G6PD expression. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 6860–6876.
16. Lin, S.-Y.; Peng, F. Association of SIRT1 and HMGA1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* **2015**, *11*, 782–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lund, T.; Holtlund, J.; Fredriksen, M.; Laland, S.G. On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett.* **1983**, *152*, 163–167. [[CrossRef](#)]
18. Qi, C.; Cao, J.; Li, M.; Liang, C.; He, Y.; Li, Y.; Li, J.; Zheng, X.; Wang, L.; Wei, B.; et al. HMGA1 Overexpression is associated with the malignant status and progression of breast cancer. *Anat. Rec.* **2018**, *301*, 1061–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Jun, K.H.; Jung, J.H.; Choi, H.J.; Shin, E.Y.; Chin, H.M. HMGA1/HMGA2 protein expression and prognostic implications in gastric cancer. *Int. J. Surg.* **2015**, *24*, 39–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kettunen, E.; Anttila, S.; Seppänen, J.K.; Karjalainen, A.; Edgren, H.; Lindström, I.; Salovaara, R.; Nissén, A.M.; Salo, J.; Mattson, K.; et al. Differentially expressed genes in non-small cell lung cancer: Expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2004**, *149*, 98–106. [[CrossRef](#)]

21. Colamaio, M.; Tosti, N.; Puca, F.; Mari, A.; Gattardo, R.; Kuzay, Y.; Federico, A.; Pepe, A.; Sarnataro, D.; Ragozzino, E.; et al. HMGA1 silencing reduces stemness and temozolomide resistance in glioblastoma stem cells. *Expert Opin. Ther. Targets* **2016**, *20*, 1169–1179. [[CrossRef](#)]
22. Czyż, W.; Balcerczak, E.; Jakubiak, M.; Pasięka, Z.; Kuzdak, K.; Mirowski, M. HMGI(Y) gene expression as a potential marker of thyroid follicular carcinoma. *Langenbeck's Arch. Surg.* **2004**, *389*, 193–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pujals, M.; Resar, L.; Villanueva, J. HMGA1, moonlighting protein function, and cellular real estate: Location, location, location! *Biomolecules* **2021**, *11*, 1334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Méndez, O.; Peg, V.; Salvans, C.; Pujals, M.; Fernández, Y.; Abasolo, I.; Pérez, J.; Matres, A.; Valeri, M.; Gregori, J.; et al. Extracellular HMGA1 promotes tumor invasion and metastasis in triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 6367–6382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, Y.-T.; Pan, S.-H.; Tsai, C.-F.; Kuo, T.-C.; Hsu, Y.-L.; Yen, H.-Y.; Choong, W.-K.; Wu, H.-Y.; Liao, Y.-C.; Hong, T.-M.; et al. Phosphoproteomics reveals HMGA1, a CK2 substrate, as a drug-resistant target in non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 44021. [[CrossRef](#)]
26. Klett, H.; Balavarca, Y.; Toth, R.; Gigic, B.; Habermann, N.; Scherer, D.; Schrotz-King, P.; Ulrich, A.; Schirmacher, P.; Herpel, E.; et al. Robust prediction of gene regulation in colorectal cancer tissues from DNA methylation profiles. *Epigenetics* **2018**, *13*, 386–397. [[CrossRef](#)]
27. Kim, M.; Park, Y.-K.; Kang, T.-W.; Lee, S.-H.; Rhee, Y.-H.; Park, J.-L.; Kim, H.-J.; Lee, D.; Lee, D.; Kim, S.-Y.; et al. Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *23*, 657–667. [[CrossRef](#)]
28. Wu, Y.; Chen, X.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Li, Y.; Xiang, C. Genome-wide DNA methylation and hydroxymethylation analysis reveal human menstrual blood-derived stem cells inhibit hepatocellular carcinoma growth through oncogenic pathway suppression via regulating 5-hmC in enhancer elements. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 151. [[CrossRef](#)]
29. Siegfried, J.M. Sex and gender differences in lung cancer and chronic obstructive lung disease. *Endocrinology* **2022**, *163*, bqab254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Rodriguez-Lara, V.; Avila-Costa, M.R. An overview of lung cancer in women and the impact of estrogen in lung carcinogenesis and lung cancer treatment. *Front. Med.* **2021**, *8*, 600121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Lee, S.J.; Lee, J.; Park, Y.S.; Lee, C.-H.; Lee, S.-M.; Yim, J.-J.; Yoo, C.-G.; Han, S.K.; Kim, Y.W. Impact of smoking on mortality of patients with non-small cell lung cancer. *Thorac. Cancer* **2013**, *5*, 43–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jung, J.; Lee, Y.J.; Kim, C.H.; Ahn, S. Landscape of epigenetically regulated lncRNAs and DNA methylation in smokers with lung adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0247928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Langevin, S.; Kratzke, R.A.; Kelsey, K.T. Epigenetics of lung cancer. *Transl. Res.* **2014**, *165*, 74–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zong, D.; Liu, X.; Li, J.; Ouyang, R.; Chen, P. The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. *Epigenetics Chromatin* **2019**, *12*, 65. [[CrossRef](#)]
35. Sekimoto, N.; Suzuki, A.; Suzuki, Y.; Sugano, S. Expression of miR-26a exhibits a negative correlation with HMGA1 and regulates cancer progression by targeting HMGA1 in lung adenocarcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *15*, 534–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ding, L.; Tian, W.; Zhang, H.; Li, W.; Ji, C.; Wang, Y.; Li, Y. MicroRNA-486-5p suppresses lung cancer via downregulating mTOR signaling in vitro and in vivo. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 655236. [[CrossRef](#)]
37. Lu, T.; Li, M.; Zhao, M.; Huang, Y.; Bi, G.; Liang, J.; Chen, Z.; Zheng, Y.; Xi, J.; Lin, Z.; et al. Metformin inhibits human non-small cell lung cancer by regulating AMPK–CEBPB–PDL1 signaling pathway. *Cancer Immunol. Immunother.* **2021**, *71*, 1733–1746. [[CrossRef](#)]
38. Li, W.; Li, X.; Li, M.; Yang, P.; Wang, X.; Li, L.; Yang, B. Lamin B1 overexpresses in lung adenocarcinoma and promotes proliferation in lung cancer cells via AKT pathway. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 3129–3139. [[CrossRef](#)]
39. Flinterman, M.B.; Mymryk, J.S.; Klanrit, P.; Yousef, A.F.; Lowe, S.W.; Caldas, C.; Gäken, J.; Farzaneh, F.; Tavassoli, M. p400 function is required for the adenovirus E1A-mediated suppression of EGFR and tumour cell killing. *Oncogene* **2007**, *26*, 6863–6874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Zhou, X.; Zhang, Z.; Liang, X. Regulatory network analysis to reveal important miRNAs and genes in non-small cell lung cancer. *Cell J. (Yakhteh)* **2019**, *21*, 459–466. [[CrossRef](#)]
41. Huang, Z.; Shen, G.; Gao, J. CDK1 promotes the stemness of lung cancer cells through interacting with Sox2. *Clin. Transl. Oncol.* **2021**, *23*, 1743–1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhao, S.; Wang, B.; Ma, Y.; Kuang, J.; Liang, J.; Yuan, Y. NUCKS1 promotes proliferation, invasion and migration of non-small cell lung cancer by upregulating CDK1 expression. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 13311–13323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jia, D.; Augert, A.; Kim, D.-W.; Eastwood, E.; Wu, N.; Ibrahim, A.H.; Kim, K.-B.; Dunn, C.T.; Pillai, S.P.; Gazdar, A.F.; et al. *Crebbp* loss drives small cell lung cancer and increases sensitivity to HDAC inhibition. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 1422–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shi, S.; Yu, G.; Huang, B.; Mi, Y.; Kang, Y.; Simon, J.P. PPAR γ could work as a valid therapeutic strategy for the treatment of lung squamous cell carcinoma. *PPAR Res.* **2020**, *2020*, 2510951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Munshi, N.; Agalioti, T.; Lomvardas, S.; Merika, M.; Chen, G.; Thanos, D. Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. *Science* **2001**, *293*, 1133–1136. [[CrossRef](#)]

46. Melillo, R.M.; Pierantoni, G.M.; Scala, S.; Battista, S.; Fedele, M.; Stella, A.; De Biasio, M.C.; Chiappetta, G.; Fidanza, V.; Condorelli, G.; et al. Critical role of the HMGI(Y) proteins in adipocytic cell growth and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 2485–2495. [[CrossRef](#)]
47. Arce-Cerezo, A.; Garcia, M.; Rodríguez-Nuevo, A.; Crosa-Bonell, M.; Enguix, N.; Pero, A.; Muñoz, S.; Roca, C.; Ramos, D.; Franckhauser, S.; et al. HMGA1 overexpression in adipose tissue impairs adipogenesis and prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14487. [[CrossRef](#)]
48. Chiefari, E.; Tanyolac, S.; Iiritano, S.; Sciacqua, A.; Capula, C.; Arcidiacono, B.; Nocera, A.; Possidente, K.; Baudi, F.; Ventura, V.; et al. A polymorphism of HMGA1 is associated with increased risk of metabolic syndrome and related components. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Pullinger, C.R.; Goldfine, I.D.; Tanyolac, S.; Movsesyan, I.; Faynboym, M.; Durlach, V.; Chiefari, E.; Foti, D.P.; Frost, P.H.; Malloy, M.J.; et al. Evidence that an HMGA1 gene variant associates with type 2 diabetes, body mass index, and high-density lipoprotein cholesterol in a Hispanic-American population. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2014**, *12*, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. De Rosa, S.; Chiefari, E.; Salerno, N.; Ventura, V.; D'Ascoli, G.L.; Arcidiacono, B.; Ambrosio, G.; Bilotta, F.L.; Torella, D.; Foti, D.; et al. HMGA1 is a novel candidate gene for myocardial infarction susceptibility. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *227*, 331–334. [[CrossRef](#)]
51. Treff, N.R.; Pouchnik, D.; Dement, G.A.; Britt, R.L.; Reeves, R. High-mobility group A1a protein regulates Ras/ERK signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 777–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Capo, A.; Sepe, R.; Pellino, G.; Milone, M.; Malapelle, U.; Pellicchia, S.; Pepe, F.; Cacciola, N.A.; Manigrasso, M.; Bruzzaniti, S.; et al. Setting up and exploitation of a nano/technological platform for the evaluation of HMGA1b protein in peripheral blood of cancer patients. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2018**, *15*, 231–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rhodes, D.R.; Yu, J.; Shanker, K.; Deshpande, N.; Varambally, R.; Ghosh, D.; Barrette, T.; Pandey, A.; Chinnaiyan, A.M. ONCOMINE: A cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **2004**, *6*, 1–6. [[CrossRef](#)]
54. Li, T.; Fu, J.; Zeng, Z.; Cohen, D.; Li, J.; Chen, Q.; Li, B.; Liu, X.S. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, W509–W514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Bartha, Á.; Györfy, B. TNMplot.com: A web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and metastatic tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chandrashekar, D.S.; Bashel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Ponce-Rodriguez, I.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)]
57. Györfy, B.; Surowiak, P.; Budczies, J.; Linczky, A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82241. [[CrossRef](#)]
58. Mizuno, H.; Kitada, K.; Nakai, K.; Sarai, A. PrognosScan: A new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Med. Genom.* **2009**, *2*, 18. [[CrossRef](#)]
59. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Nastou, K.C.; Lyon, D.; Kirsch, R.; Pyysalo, S.; Doncheva, N.T.; Legeay, M.; Fang, T.; Bork, P.; et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D605–D612. [[CrossRef](#)]
61. Tang, Z.; Li, C.; Kang, B.; Gao, G.; Li, C.; Zhang, Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W98–W102. [[CrossRef](#)]



HMGA1 gene expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: preliminary report

Lias Saed¹ · Ewa Balcerzak¹ · Mariusz Łochowski² · Ewa Olechnowicz¹ · Aleksandra Sałagacka-Kubiak¹

Received: 14 January 2022 / Accepted: 28 July 2022 / Published online: 10 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

The study aimed to assess the *HMGA1* gene expression level in NSCLC patients and to evaluate its association with selected clinicopathological features and overall survival of patients. The expression of the *HMGA1*, coding non-histone transcription regulator *HMGA1*, was previously proved to correlate with the ability of cancer cells to metastasize the advancement of the disease. The prognostic value of the *HMGA1* expression level was demonstrated in some neoplasms, e.g., pancreatic, gastric, endometrial, hepatocellular cancer, but the knowledge about its role in non-small cell lung cancer (NSCLC) is still limited. Thus, the *HMGA1* expression level was evaluated by real-time PCR method in postoperative tumor tissue and blood samples collected at the time of diagnosis, 100 days and 1 year after surgery from 47 NSCLC patients. Mean *HMGA1* expression level in blood decreased systematically from the time of cancer diagnosis to 1 year after surgery. The blood *HMGA1* expression level 1 year after surgery was associated with the tobacco smoking status of patients ($p=0.0230$). Patients with high blood *HMGA1* expression levels measured 100 days after surgery tend to have worse overall survival than those with low expression levels ($p=0.1197$). Tumor *HMGA1* expression level was associated with neither features nor the overall survival of NSCLC patients. Moreover, no correlation between *HMGA1* expression level measured in tumor tissue and blood samples was stated. Blood *HMGA1* mRNA level could be a promising factor in the prognostication of non-small cell lung cancer patients.

Keywords HMGA1 · Gene expression · Lung cancer · Prognosis · Liquid biopsy

Introduction

Despite advances in the understanding of risk factors, pathogenesis, and treatment methods for lung cancer, it remains one of the most prevalent and also the most deadly neoplasm worldwide. According to data published by The Global Cancer Observatory, lung cancer accounted for 11.4% of all malignant neoplasms diagnosed in the world in 2020. Almost one in five cancer deaths in 2020 in the world was caused by lung cancer (W.H.O 2020). As prognosis and treatment outcomes of lung cancer patients are strongly influenced by the clinical advancement of the disease at the

time of diagnosis, new prognostic and predictive factors are still being sought.

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common lung cancer type accounting for 85% of its cases. The development of NSCLC is driven by genetic mutation, the most important of which are those in epidermal growth factor receptor (EGFR) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) genes (Gridelli et al. 2015). In-depth analyses of genomes and signaling pathways revealed the NSCLCs is a group of distinct diseases with genetic and cellular heterogeneity, which determine the optimal management strategy, including surgery, radiochemotherapy, immunotherapy and targeted approaches with tyrosine kinase inhibitors or anti-angiogenic monoclonal antibodies. The complexity of somatic alterations in NSCLCs includes transcription factors, splicing factors and epigenome modifiers, genes involved in cellular immunity (Chen et al. 2014).

High-mobility group AT-hook 1 (HMGA1, previously HMG-I/HMG-Y) is a chromatin architectural factor that binds to the minor groove of AT-rich DNA. It influences chromatin structure enabling transcription factors to

Communicated by Shuhua Xu.

✉ Aleksandra Sałagacka-Kubiak
aleksandra.salagacka@umed.lodz.pl

¹ Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

² Department of Thoracic Surgery, Memorial Copernicus Hospital, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

assembly and control the expression of various downstream genes. In this way, HMGA1 is involved in crucial cellular processes like differentiation, apoptosis, DNA damage repair, cell cycle regulation, cellular senescence, but also in neoplastic transformation. It is encoded by the *HMGA1* gene which produces two protein isoforms HMGA1a and HMGA1b identical in sequence except for the deletion of the 11 amino acid stretch in the HMGA1b protein between the first and second DNA-binding domains (Sumter et al. 2016).

In addition to its presence in the nucleus of HMGA1, where it acts as a transcription regulator of different signaling pathways, it has been discovered that it may also be secreted and plays its oncogenic role outside the cell. Méndez et al. (2018) showed the blocking of extracellular HMGA1 decreased metastatic burden in a xenograft model of triple-negative breast cancer (TNBC). Moreover, in TNBC patients, an extracellular location of HMGA1 was connected with the incidence of metastasis. They also demonstrated that extracellular HMGA1 is a ligand for the Advanced glycosylation end product-specific receptor (RAGE), inducing pERK signaling and increasing migration and invasion of cancer cells.

The expression level of *HMGA* genes is high during embryonic development, but low or undetectable in completely differentiated, non-dividing cells of a mature organism, which implies the involvement of the products of expression of these genes in the regulation of cellular proliferation and embryonic growth (Reeves 2001; Reeves & Beckerbauer 2001; Wisniewski & Schwanbeck 2000). Contrary to normal somatic cells, the levels of *HMGA1* products are often increased in tumor-transformed cells and correlate with the advancement of the disease or the ability to metastasize. Association between the overexpression of full-length HMGA proteins and tumor progression was found in colorectal, prostate, breast, and thyroid cancer (Wisniewski & Schwanbeck 2000).

The expression of both the *HMGA1* gene and the HMGA1 protein was proved to be up-regulated in many different lung cancer cell lines compared with normal human lung bronchial epithelium cells (Hillion et al. 2009). Also, most primary lung tumors showed higher expression of the *HMGA1* gene than in the normal lung tissue (Hillion et al. 2009; Sarhadi et al. 2006). Zhang et al. (2019) showed that high HMGA1 expression in the NSCLC tissue is connected with a higher TNM stage. NSCLC patients with higher staining of the HMGA1 in cancer tissue had worse OS than those the lower staining. Based on publicly available cancer data, *HMGA1* was shown to be overexpressed in both SCLC and NSCLC, with higher expression compared to both the adjacent non-malignant lung tissues and non-tumor lung tissues of healthy individuals. Elevated *HMGA1* expression was connected with some clinicopathological features like sex, age, and TNM stage. The high *HMGA1* expression

level was connected with shorter overall and first progression survival time among lung adenocarcinoma patients, but not lung squamous cell carcinoma patients (Saed et al. 2022). However, the exact role of *HMGA1* in lung cancer pathogenesis is not fully understood.

Some studies provide evidence that *HMGA1* is responsible for carcinogenic dysregulation of crucial gene pathways or miRNAs in many tumor types, including lung cancer (Pallante et al. 2015). RNA profiling of lung epithelial cells expressing a mutant allele of *PIK3* revealed HMGA1 is a part of transcription factor network connected with aberrant PIK3/AKT signaling in lung cancer, and NSCLC-derived cultured cells with activated AKT presented higher *HMGA1* expression levels than the cells with low AKT activation (Scrima et al. 2012). The bioinformatic analysis identifies the *HMGA1* to be one of the top 10 genes in the miRNA-gene regulatory network in NSCLC (Zhou et al. 2020). Zhang et al. (2011) showed that in NSCLC cells *HMGA1* directly enhances the transcriptional activity of miR-222 and in consequence, it upregulates pAKT signaling. Induction of IL-24, a novel tumor suppressor cytokine in the H1299 lung cancer cell line, was associated with markedly reduced *HMGA1* expression level, miR22-3p and -5p levels with a concomitant decrease in pAKT expression (Panneerselvam et al. 2016). Hillion et al. (2009) demonstrated that *HMGA1* can act as an oncogene that drives cell transformation in undifferentiated, large-cell lung cancer phenotype. This process is mediated by *HMGA1*-dependent upregulation of the matrix metalloproteinase-2 gene (*MMP-2*) which promotes migration and invasion of H1299 large-cell carcinoma cells. Building a HMGA1-centered protein–protein interaction network (Saed et al. 2022) revealed that the protein could interact with proteins involved in cellular senescence and cell cycle control (TP53, RB1, RPS6KB1, and CDK1), transcription regulation (EP400 and HMGA2), chromatin assembly and remodeling (LMNB1), and cholesterol and isoprene biosynthesis (HMGCR and INSIG1).

Additionally, HMGA1 could also contribute to the poor outcome of lung cancer treatment using both conventional and targeted drugs. Recently it was demonstrated that the protein participates in the forkhead box protein M1-high-mobility group AT-hook 1-G6PD (FOXO1-HMGA1-G6PD) transcriptional regulatory pathway which activated enhanced the cisplatin resistance of NSCLC cells (Zhang et al. 2019). Some evidence was shown that the phosphorylation level of HMGA1 protein contributes to EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance by affecting EGFR downstream signaling. Knockdown of *HMGA1* expression in human lung adenocarcinoma cell line reinforced gefitinib efficiency by reactivation of EGFR or PDGF downstream signaling (Wang et al. 2017).

Blocking the HMGA1 function could have therapeutic implications. Decreased proliferation and enhanced

apoptosis were observed in human thyroid anaplastic carcinoma cell lines after the suppression of HMGI(Y) protein synthesis by an HMGI(Y) antisense adenoviral vector (Scala et al. 2000). Similarly, a reduction in cell viability and increased sensitivity to gemcitabine was observed in five different pancreatic and liver cancer cell lines after infection with replication-defective engineered adenovirus containing the HMGA1 decoy hyper binding sites (Hassan et al. 2018). siRNA-mediated knockdown HMGA1 in combination with IL-24 reduced markedly AKT expression and substantially reduced migration and invasion of cultured lung cancer cells (Panneerselvam et al. 2016).

Considering the limited knowledge about the role of the *HMGA1* in lung cancer transformation as well as putative prognostic, predictive, and therapeutic value of the gene, we aimed to appraise the importance of the *HMGA1* expression level in tissue and blood samples of NSCLC patients. The presented study provides some evidence that tissue *HMGA1* expression is markedly up-regulated during carcinogenesis in the lung. Moreover, blood *HMGA1* mRNA level could decrease in time after tumor resection and could be connected with the survival of patients.

Materials and methods

Investigated group

The investigated group comprised 46 NSCLC patients (8 females and 38 males) diagnosed and treated at the N. Copernicus Regional Specialist Hospital in Lodz, Poland. The mean age at the time of diagnosis was 66.9 years (min. 54 years, max. 82 years). All patients underwent surgical resection. In 16 cases, adjuvant chemotherapy was included after the surgery (carboplatin + gemcitabine 2 or cisplatin + etoposide 2 or cisplatin + vinorelbine 9). Between 2016 and 2018, tissue sections and peripheral blood samples were collected from the patients: 40 blood samples—at time of diagnosis of cancer; 39 blood samples—100 days after the surgery; 24 blood samples—1 year after the surgery, and 46 frozen tissue sections taken intraoperatively.

RNA isolation

RNA from blood and tissue sections were isolated according to “Blood Mini” and “Total RNA Mini” protocol, respectively (A&A Biotechnology, Poland). The purity and concentration of RNA samples were assessed spectrophotometrically. The concentration of extracted RNA ranged from 5.2 to 80.0 ng/μl. RNA samples were stored at –76 °C until the analysis.

Reverse transcription

A total RNA was transcribed into complementary DNA (cDNA) following the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protocol (Applied Biosystems, USA). The final concentration of RNA in the reaction mixture was 0.02 μg/μl. Obtained cDNA was stored at –20 °C until analysis. To check cDNA synthesis efficacy, PCR for *GAPDH* gene was conducted. In all samples, the presence of PCR product for the *GAPDH* (133 bp) was stated.

Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

Quantification assessment of expression of both the investigated gene and the reference gene was performed by real-time PCR using the Rotor-Gene 6000 (Corbet Research, Germany). The reaction mixture for both genes consisted of 10 μl 2×Bimake™ SYBR Green qPCR Master Mix, 0.3 μl of each primer (*HMGA* gene: F 5'-CAACACCTAAGAGACCTCG -3', R 5'-TCCTCTCCTCCTCTCTCC-3'; *GAPDH* gene F.

5'-ACAGTCCCATGTAGACC-3', R 5'-TTGAGCACA GGGTACTTTA -3'), 0.5 μl of cDNA and distilled water up to 20 μl final volume. The reactions for *HMGA* and *GAPDH* were carried out in separate tubes. For confirmation of reaction specificity, melting curve analysis after each reaction set was carried out. The temperature profile of real-time PCR was as follow: hold 95 °C/10 min, cycling (40x)—95 °C/10 min, 58 °C/15 s, 72 °C/20 s, melting 72 °C–95 °C. Samples were tested in triplicates and the mean of obtained Ct values for both genes was calculated. In each experiment, negative control (distilled water instead of cDNA) also in triplicates, was included. Additionally, relative standard curves for both investigated and reference genes were plotted. To this basis, the efficiency of the reactions was determined: 95.18% for the *HMGA1* gene, 101.26% for the *GAPDH* gene. The relative expression level of the investigated gene was calculated using a method developed by Pfaffl (2001) and analyzed after the decimal logarithmic transformation.

Statistical analysis

Statistical analysis of data generated in the research was performed using Dell Statistica (data analysis software system), version 13 (Dell Inc., 2016, software.dell.com). The conformity of continuous variables with normal distribution was checked using the Shapiro–Wilk test. To determine the significance of differences in gene expression according to clinical data, analysis of variance with repeated values, paired-sample t-test, Student t-test, Pearson and Spearman

correlation was used. Survival analysis was conducted applying Kaplan–Meier plots and log-rank test. A p -value < 0.05 was assumed as significant in all tests conducted.

Results

The expression level of HMGA1 gene in tumor tissue and blood samples

The *HMGA1* expression level was successfully determined in 28 blood samples collected at the time of diagnosis of cancer, 21 blood samples collected 100 days after the surgery, and 11 blood samples collected 1 year after the surgery. The mean blood expression level decrease in time (Fig. 1). The blood expression level at the time of cancer diagnosis was higher than the level measured 100 days after with marginal statistical significance ($p = 0.0502$). The level at the time of diagnosis was also visibly higher than the level measured 1 year after surgery but the difference was not significant ($p = 0.1838$). There was no significant difference in the level between samples collected 100 days and 1 year after surgery ($p = 0.8350$).

The *HMGA1* expression level was also determined in 46 frozen tissue sections taken intraoperatively. The levels of expression measured in cancer tissue and blood samples taken at the time of diagnosis did not differ significantly ($p = 0.8290$). However, the expression level in tissue was significantly higher than the level determined in blood samples collected after treatment—both 100 days and 1 year after surgery ($p = 0.0429$ and $p = 0.0182$, respectively, Fig. 1.).

Association between the expression level of HMGA1 gene and selected clinicopathological features

Next, the connection between the *HMGA1* expression level in tissue and blood samples and selected clinicopathological features was sought (Table 1.). The level was compared between subgroups of patients divided according to gender, tobacco smoking status, histological type of cancer, TNM stage, and grade of malignancy. The *HMGA1* expression level measured 1 year after surgery was significantly higher in smokers than in non-smokers ($p = 0.0230$) (Fig. 2). P -values for the analyzed association are summarized in Table 1.

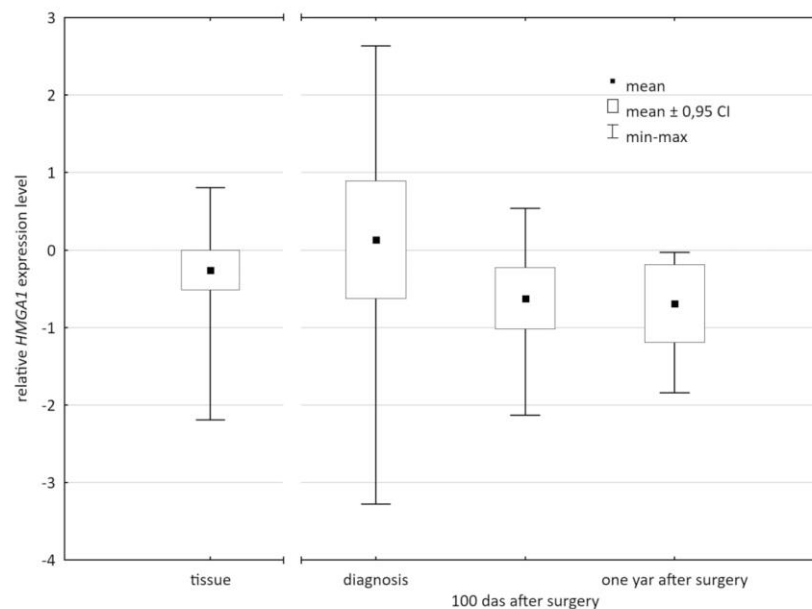
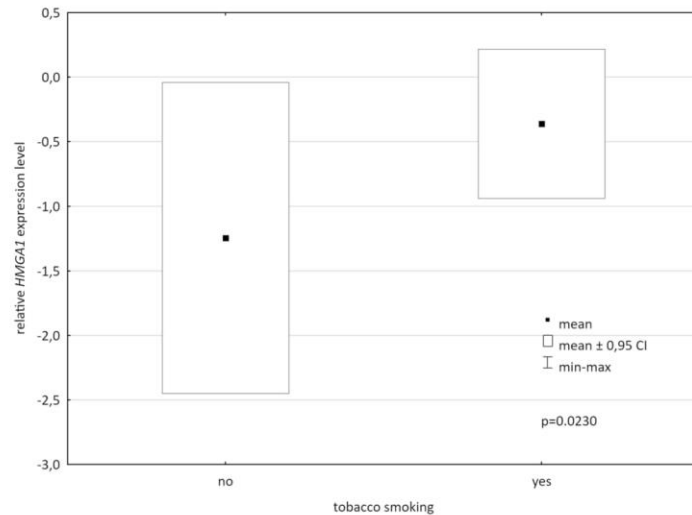


Fig. 1 Relative *HMGA1* expression level in cancer tissue and blood samples at three time points

Fig. 2 Relative *HMGA1* expression level measured 1 year after surgery concerning tobacco smoking status



The expression level of *HMGA1* gene and survival of NSCLC patients

Lastly, the relationship between the overall survival time of patients and the level of the *HMGA1* expression in NSCLC tissue was analyzed. For this purpose, the study cohort was split into two subgroups with the level of *HMGA1* expression above (low expression $n = 24$) and below (high expression $n = 22$) the mean level of the entire study group. We did not state any association between the probability of survival of the patients and the *HMGA1* expression level ($p = 0.8472$, log-rank test; Fig. 3A.).

Next, an analogous analysis for the level of *HMGA1* expression in blood samples for each time point studied (diagnosis, 100 days after surgery, and 1 year after surgery) was done. At the time of diagnosis, the level of *HMGA1* expression did not differentiate patients in terms of survival time (low expression $n = 18$, high expression $n = 16$, $p = 0.3353$; log-rank test; Fig. 3B.). However, when the expression level measured 100 days after surgery was analyzed, a clear trend towards reduced over survival time in the high-expression patients was stated (low expression $n = 10$, high expression $n = 11$; $p = 0.1197$; log-rank test; Fig. 3C). The same but less pronounced tendency was observed when overall survival time concerning the *HMGA1* expression level measured 1 year after surgery was inspected. However, no statistically significant difference in the OS between the high and low expression level subgroups was revealed (low expression $n = 5$, high expression $n = 6$, $p = 0.4219$; log-rank test; Fig. 3D.).

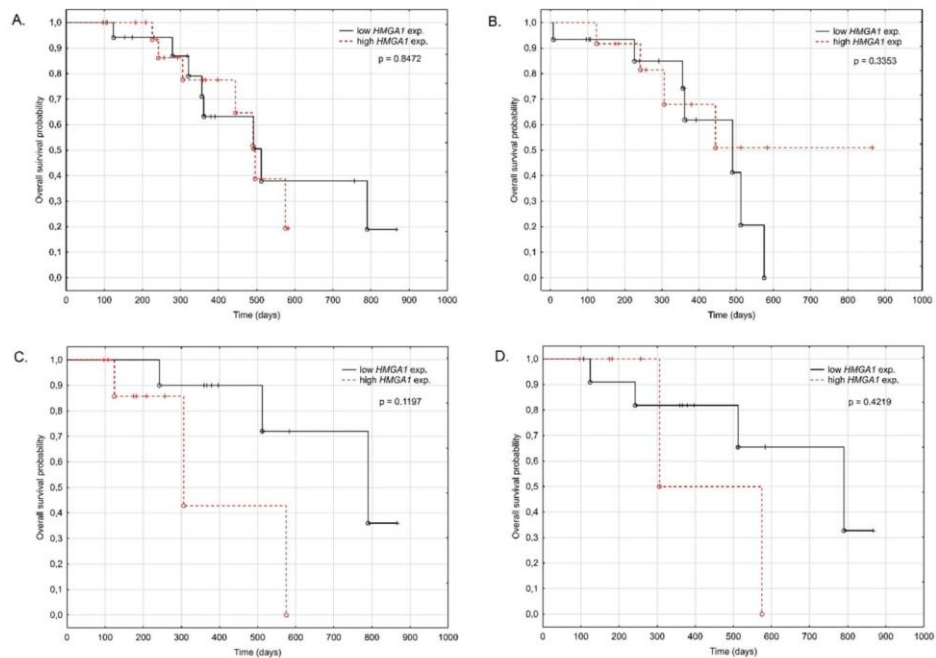
Discussion

Overexpression of the *HMGA1* gene, as well as increased levels of the protein encoded by this gene, was confirmed in many different lung cancer cell lines compared to normal epithelium bronchitis (Hillion et al. 2009; Ma et al. 2019). Also, most of the primary lung tumors studied showed higher *HMGA1* gene expression than normal lung tissue (Barh et al. 2013; Hillion et al. 2009; Ma et al. 2019). The overexpression of the *HMGA1* gene and its protein in lung cancer tissue, as well as their involvement in key signaling pathways in the development of the tumor, justified the search for their prognostic significance in lung cancer. However, only a few research reports about the importance of the *HMGA1* gene and *HMGA1* protein expression as a prognostic factor in lung cancer are published to date. Zhang et al. (2015) showed that high *HMGA1* protein expression in neoplastic tissue of NSCLC was associated with the size of the neoplastic tumor, the presence of lymph node and distant metastases, and with higher advancement according to the TNM classification, and these observations were confirmed by the results obtained by Zhang et al. (2019). Contrarily, in our study, we did not find the association between *HMGA1* gene expression level determined in NSCLC tissue and the TNM stage.

Previously, it was observed that a number of positively staining cells for *HMGA1* by immunohistochemistry was lower in metaplasia and higher in dysplasia and carcinoma in situ of the bronchial epithelium (Sarhadi et al. 2006)

Table 1 *P*-values for the association between relative *HMGA1* expression level and clinicopathological features

Feature	Relative <i>HMGA1</i> expression level			
	Cancer tissue (<i>n</i> =46)	Peripheral blood		
		At the time of diagnosis (<i>n</i> =28)	100 days after surgery (<i>n</i> =21)	1 year after surgery (<i>n</i> =11)
Gender (men vs woman) ^a	0.3261 (38/8)	0.7452 (21/7)	0.6038 (16/5)	0.4882 (9/2)
Age ^b	0.7912	0.3915	0.2206	0.2466
Tobacco smoking (smokers vs non-smokers) ^a	0.2283 (29/17)	0.6048 (15/13)	0.2812 (12/9)	0.0230 (7/4)
Histological type (adenocarcinoma vs squamous cell carcinoma) ^a	0.5626 (26/20)	0.4077 (14/14)	0.4687 (11/10)	0.6383 (6/5)
TMN stage (IA1 and/or IA2 and/or IB vs IIA and/or IIB and/or IIIA) ^a	0.4339 (22/24)	0.9230 (13/15)	0.5674 (10/11)	0.8057 (6/5)
Grade of malignancy (G1 and/or G2 vs G3) ^a	0.7157 (34/12)	0.8433 (21/7)	0.9085 (16/5)	0.3688 (9/2)

^aStudent's *t*-test^bSpearman's correlation rank**Fig. 3** Overall survival probability according to *HMGA1* expression level measured in cancer tissue (A) and blood samples collected at the time of diagnosis (B), 100 days after surgery (C), and 1 year after surgery (D)

which could suggest that *HMGA1* expression increases during carcinogenesis progress. The connection between *HMGA1* protein expression in NSCLC tissue and poor

histological differentiation of tumors was concordantly reported by Zhang et al. (2015) and Lin and Peng (2016) but not by Zhang et al. (2019). We did not find the association

between *HMGA1* gene expression level determined in NSCLC tissue and grade of malignancy in our study group.

Kettunen et al. (2004) showed that the *HMGA1* gene is commonly up-regulated in both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of NSCLC, and Sarhadi et al. (2006) detected HMGA1 protein in a high proportion of lung cancer tumors irrespective of the histological type. No significant difference in the *HMGA1* gene expression level between cancer tissues of different histological types was stated in our study. Similarly, no major difference between NSCLC histological subtypes in *HMGA1* gene or protein expression was observed by Zhang et al. (2014) and Zhang et al. (2019) but HMGA1 protein was detected more often in the squamous cell carcinoma subtype compared to adenocarcinoma by Lin and Peng (2016).

Previously published research did not confirm the presence of an association between the HMGA1 protein expression in lung cancer tissue and age, gender, or smoking status of enrolled patients (Zhang et al. 2015, 2019; Lin and Peng 2016) expect the research of Lin and Peng (2016) who observed the tissue HMGA1 expression more frequently in males than females. Similarly, in our study, the level of *HMGA1* expression measured in cancer tissue was not connected with age, gender, or smoking status.

As *HMGA1* gene or HMGA1 protein expression level was associated with such features as the stage of TNM or histological differentiation of neoplastic cells, it can be presumed that the level of its expression will be related to the survival time of patients. Indeed, Sarhadi et al. (2006) showed a correlation between the nuclear expression of the HMGA1 protein and the shorter survival time of patients with lung adenocarcinoma (but not SSC), although this expression was not related to the proliferation or the apoptotic index of cancer cells. Moreover, nuclear staining of HMGA1 protein remained a significant factor influencing survival probability, even after taking into account the confounding variables in multivariate analysis. Similarly, in the research conducted by Zhang et al. (2015), high HMGA1 protein expression turned out to be an independent negative prognostic factor and was associated with a shorter survival time of NSCLC patients. However, not all studies conducted so far have confirmed the association between the amount of HMGA1 protein in neoplastic tissue and the survival time of lung cancer patients. Such a correlation was not noted by Lin and Peng (2016), although in their study the presence of the HMGA1 protein in NSCLC tissue samples was associated with poor histological differentiation of the tumor. According to the Kaplan–Meier Plotter (Ma et al. 2019), high expression of the *HMGA1* gene was connected with a shorter survival time of patients with NSCLC. However, we also did not state any association between *HMGA1* mRNA level in NSCLC tissue and overall survival time in our study group. It could be speculated that the effect of the *HMGA1* on the progression

of NSCLC is probably dependent on other factors. For instance, in a study published by Zhang et al. (2019) the increased amount of HMGA1 protein found in NSCLC tissue was connected with shorter overall survival compared to patients with a low amount of HMGA1. However, the amount of HMGA1 protein in cancer tissue correlated with the amount of FOXM1 and G6PD, with which HMGA1 forms a common pathway for transcriptional regulation and which were similarly associated with TNM stage and overall survival (Zhang et al. 2019).

In the presented research, we screened for the first time the expression of the *HMGA1* gene in the peripheral blood samples of NSCLC patients and its changes in time. To date, some studies have investigated the *HMGA2* gene, another member of the high-mobility group family, to identify molecular diagnostic and prognostic markers in cancer using minimally invasive processes. Sezer et al. (2000) detected the *HMGA2* expression in the blood samples of metastatic breast cancer patients but not healthy donors nor non-metastatic patients. Moreover, the presence of *HMGA2* expression correlated with a worse prognosis. Later, Langelotz et al. (2003) stated that the presence of the *HMGA2* expression detected in the peripheral blood of metastatic breast cancer patients is connected with disease-specific survival and remains an independent prognostic for overall survival. On this basis, the gene was proposed as a potential marker for the early detection of circulating tumor cells in peripheral blood, but further research did not confirm these findings (Fabjani et al. 2005). *HMGA2* expression detectable in peripheral blood of CML patients correlated significantly with WBC count which indicates that the overexpression is connected with the undifferentiated phenotype of leukemic cells accumulation during the progression of chronic state to blast crisis (Meyer et al. 2007). Galdiero et al. (2015) proposed the circulating HMGA2 specific mRNA as a tool for early detection of epithelial ovarian cancer as it was found exclusively in the plasma of cancer patients but not healthy donors. The level of circulating mRNA was significantly higher than in healthy volunteers and substantially associated with tumor location, nerve infiltration, vascular invasion, MSI status and serum CA199 level (Sahengbieke et al. 2018). These promising findings encouraged our research on NSCLC cancer.

To our best knowledge, there were no data available to date on the expression of *HMGA1* in the peripheral blood of cancer patients except this published by Barth et al. (2013). Using the microRNA expression profile, in silico analysis based on reverse-transcriptomics, and interactome analysis, they selected seven transcription factors that could be biomarkers in the diagnosis of lung cancer. One of them was the *HMGA1*, which was significantly overexpressed in neoplastic tissue and the blood of both in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma patients in the

validation experiment. The *HMGA1* gene also belonged to a panel of selected transcription factor genes, the expression of which allowed for the differentiation of small cell and non-small cell carcinoma. Increased expression of the *HMGA1* gene was found in the blood of a limited cohort of NSCLC patients, compared to healthy subjects (Barh et al. 2013). We found that the *HMGA1* expression in the blood tends to decrease after surgical removal of the NSCLC tumor that could suggest tumor cells are the substantial source of *HMGA1* expression measured in the blood. It is believed that circulating tumor cells are shredded into the circulation by tumors in the early stages of cancer and are responsible for the development of latent metastases (Grzybowska and Fabisiewicz 2017). However, according to the Human Protein Atlas (Uhlen et al. 2017) the *HMGA1* expression was detected in all blood cell types, so the type of cells being the source of measured *HMGA1* transcript level should be specified in the future. We did not state a significant connection between the clinical advancement of the cancer disease and blood *HMGA1* expression level. Despite that, a clear tendency towards shorter over survival time in patients with high *HMGA1* expression levels measured 100 days after surgery was noted.

We also stated that the *HMGA1* expression level measured 1 year after surgery was significantly higher in smokers. Previously, it was found that the overall mortality of ever-smokers is higher than that of never-smokers in NSCLC patients, and current smoking is an independent risk factor for a poorer prognosis (Lee et al. 2014). Recently, some connection between the *HMGA1* expression and tobacco smoking status in lung adenocarcinoma (LUAD) was shown by Jung et al. (2021). When comparing TCGA data for the smoker LUAD and normal lung tissue, they found *HMGA1* as one of the six genes up-regulated and simultaneously inversely correlated with DNA methylation level in LUAD. This finding was further validated in clinical specimens of the smoker and never-smoker LUAD patients, revealing *HMGA1* displays borderline differences in CpG methylation between comparing cohorts. As it is widely known that cigarette smoke affects DNA methylation, and thus is a critical factor in the development of lung cancer (Zong et al. 2019; Dammann et al. 2005), it may, at least in part, explain the observed differences in blood *HMGA1* expression level associated with smoking status.

In conclusion, we examined, for the first time, the expression level of the *HMGA1* gene parallelly in tissue and blood samples of NSCLC patients. We screened the changes of *HMGA1* expression levels in the blood and noted the expression tends to decrease after surgical removal of the tumor over time. Our findings suggest the blood *HMGA1* expression level could be connected to the progression of the disease. These valuable results encourage us to broaden the study by the *HMGA1* protein analysis in the future. Since

detection of the expression might be useful for the selection of treatment schedule as well as monitoring of therapy response, it warrants further investigation in the field.

Acknowledgements The present study was supported by the statutory funds of the Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz (Grant No. 503/3-015-02/503-31-001-19-00).

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. Material and clinical data collection were performed by ME. Gene expression analysis was performed by EO, EB and LS. Statistical analysis of the obtained data was performed by AS-K. The first draft of the manuscript was written by LS and AS-K and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding The present study was supported by the statutory funds of the Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Medical University of Lodz (Grant No. 503/3-015-02/503-31-001-19-00).

Declarations

Conflict of interests The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval and consent to participate The presented study was approved by The Ethics Committee of the Medical University of Lodz (No RNN/87/16/KE) and stays in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The patients' written informed consent was obtained before they participated in the research.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- The Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer WHO (2020) Lung Cancer—Fact Sheet. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>. Accessed 9 Aug 2022
- Barh D, Jain N, Tiwari S, Field JK, Padin-Iruegas E, Ruibal A, López R, Herranz M, Bhattacharya A, Juneja L, Viero C, Silva A, Miyoshi A, Kumar A, Blum K, Azevedo V, Ghosh P, Liloglou T (2013) A novel in silico reverse-transcriptomics-based identification and blood-based validation of a panel of sub-type specific biomarkers in lung cancer. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S6-S5>

- Chen Z, Fillmore CM, Hammerman P, Kim CF, Wong KK (2014) Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 14(8):535–546. <https://doi.org/10.1038/nrc3775>
- Dammann R, Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Rastetter M, Papritz M, Hattenhorst UE, Hofmann HS, Silber RE, Burdach S, Hansen G (2005) CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *Eur J Cancer* 41(8):1223–1236. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.02.020>
- Fabjani G, Tong D, Wolf A, Roka S, Leodolter S, Hoecker P, Fischer MB, Jakesz R, Zeillinger R (2005) HMGA2 is associated with invasiveness but not a suitable marker for the detection of circulating tumor cells in breast cancer. *Oncol Rep* 14(3):737–741
- Galdiero F, Romano A, Pasquinielli R, Pignata S, Greggi S, Vuttariello E, Bello AM, Calise C, Scaffa C, Pisano C, Losito NS, Fusco A, Califano D, Chiappetta G (2015) Detection of high mobility group A2 specific mRNA in the plasma of patients affected by epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 6(22):19328–19335. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2896>
- Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, Petrella F, Spaggiari L, Rosell R (2015) Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* 1:15009. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9> (PMID: 27188576)
- Grzybowska EA, Fabisiewicz A (2017) Circulating tumor cells and their clinical significance. *NOWOTWORY J Oncol* 67(4):243–250. <https://doi.org/10.5603/NJO.2017.0039>
- Hassan F, Ni S, Arnett TC, McKell MC, Kennedy MA (2018) Adenovirus-mediated delivery of decoy hyper binding sites targeting oncogenic HMGA1 reduces pancreatic and liver cancer cell viability. *Mol Ther Oncol* 8:52–61. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2018.01.002>
- Hillion J, Wood LJ, Mukherjee M, Bhattacharya R, Di Cello F, Kowalski J, Elbahloul O, Segal J, Poirier J, Rudin CM, Dhara S, Belton A, Joseph B, Zucker S, Resar LMS (2009) Upregulation of MMP-2 by HMGA1 promotes transformation in undifferentiated, large-cell lung cancer. *Mol Cancer Res* 7(11):1803–1812. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0336>
- Jung J, Lee YJ, Kim CH, Ahn S (2021) Landscape of epigenetically regulated lncRNAs and DNA methylation in smokers with lung adenocarcinoma. *PLoS ONE* 16(3):e0247928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247928>
- Kettunen E, Anttila S, Seppänen JK, Karjalainen A, Edgren H, Lindström J, Salovaara R, Nissén AM, Salo J, Mattson K, Hollmén J, Knuutila S, Wikman H (2004) Differentially expressed genes in nonsmall cell lung cancer: expression profiling of cancer-related genes in squamous cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 149(2):98–106. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(03)00300-5)
- Langelotz C, Schmid P, Jakob C, Heider U, Wernecke KD, Possinger K, Sezer O (2003) Expression of high-mobility-group-protein HMGI-C mRNA in the peripheral blood is an independent poor prognostic indicator for survival in metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 88(9):1406–1410. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600935>
- Lee SJ, Lee J, Park YS, Lee CH, Lee SM, Yim JJ, Yoo CG, Han SK, Kim YW (2014) Impact of smoking on mortality of patients with non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer* 5(1):43–49. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12051>
- Lin SY, Peng F (2016) Association of SIRT1 and HMGA1 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 11(1):782–788. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3914>
- Ma Yu, Li X, Chen S, Du B, Li Y (2019) MicroRNA-4458 suppresses migration and epithelial-mesenchymal transition via targeting HMGA1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Manage Res* 11:637–649. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S185117>
- Méndez O, Peg V, Salvans C, Pujals M, Fernández Y, Abasolo I, Pérez J, Matres A, Valeri M, Gregori J, Villarreal L, Schwartz S Jr, Cajal RY, S, Tabernero J, Cortés J, Arribas J, Villanueva J. (2018) Extracellular HMGA1 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 24(24):6367–6382. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0517>
- Meyer B, Krisponeit D, Junghans C, Murua Escobar H, Bullerdiek J (2007) Quantitative expression analysis in peripheral blood of patients with chronic myeloid leukaemia: correlation between HMGA2 expression and white blood cell count. *Leuk Lymphoma* 48(10):2008–2013. <https://doi.org/10.1080/10428190701559116>
- Pallante P, Sepe R, Puca F, Fusco A (2015) High mobility group A proteins as tumor markers. *Oncotarget* 7(43):70247–70263. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00015>
- Panneerselvam J, Srivastava A, Muralidharan R, Wang Q, Zheng W, Zhao L, Chen A, Zhao YD, Munshi A, Ramesh R (2016) IL-24 modulates the high mobility group (HMG) A1/miR222/AKT signaling in lung cancer cells. *Oncotarget* 7(43):70247–70263. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11838>
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Reeves R (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277(1–2):63–81. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00689-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00689-8)
- Reeves R, Beckerbauer L (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519(1–2):13–29. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00215-9)
- Saed L, Jelefi A, Mirowski M, Salagacka-Kubiak A (2022) Prognostic Significance of HMGA1 Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis. *Int J Mol Sci* 23(13):6933. <https://doi.org/10.3390/ijms23136933>
- Sahengbieke S, Wang J, Li X, Wang Y, Lai M, Wu J (2018) Circulating cell-free high mobility group AT-hook 2 mRNA as a detection marker in the serum of colorectal cancer patients. *J Clin Lab Anal* 2(4):e22332. <https://doi.org/10.1002/jcla.22332>
- Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, Karjalainen A, Knuutila S, Anttila S (2006) Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* 209(2):206–212. <https://doi.org/10.1002/path.1960>
- Scala S, Portella G, Fedele M, Chiappetta G, Fusco A (2000) Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8):4256–4261. <https://doi.org/10.1073/pnas.070029997>
- Scrima M, de Marco C, Fabiani F, Franco R, Pirozzi G, Rocco G, Ravo M, Weisz A, Zoppioli P, Ceccarelli M, Botti G, Malanga D, Viglietto G (2012) Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030427>
- Sezer O, Langelotz C, Blohmer JU, Schmid P, Akrivakis K, Possinger K (2000) Detection of HMGI-C in the peripheral blood of breast cancer patients. *Eur J Cancer* 36(15):1944–1948. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00199-4)
- Sumter TF, Xian L, Huso T, Koo M, Chang YT, Almasri TN, Chia L, Inglis C, Reid D, Resar LM (2016) The High Mobility Group A1 (HMGA1) transcriptome in cancer and development. *Curr Mol Med* 16(4):353–393. <https://doi.org/10.2174/1566524016666160316152147>
- Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfaisas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk JM, Brunnström H, Glimelius B, Sjöblom T, Edqvist PH, Djureinovic D, Mücke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Ponten F (2017) A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>

- Wang YT, Pan SH, Tsai CF, Kuo TC, Hsu YL, Yen HY, Choong WK, Wu HY, Liao YC, Hong TM, Sung TY, Yang PC, Chen YJ (2017) Phosphoproteomics Reveals HMGA1, a CK2 Substrate, as a Drug-Resistant Target in Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 7:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep44021>
- Wisniewski JR, Schwanbeck R (2000) High mobility group I/Y: multifunctional chromosomal proteins causally involved in tumor progression and malignant transformation. *Int J Mol Med* 6(4):409–419. <https://doi.org/10.3892/ijmm.6.4.409>
- Zhang Y, Ma T, Yang S, Xi M, Xu J, An H, Yang Y, Li S (2011) High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells. *Mol Cell Biochem* 357(1–2):363–371. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0907-1>
- Zhang Z, Wang Q, Chen F, Liu J (2015) Elevated expression of HMGA1 correlates with the malignant status and prognosis of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 36(2):1213–1219. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2749-4>
- Zhang R, Tao F, Ruan S, Hu M, Hu Y, Fang Z, Mei L, Gong C (2019) The TGFβ1-FOXM1-HMGA1-TGFβ1 positive feedback loop increases the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer by inducing G6PD expression. *Am J Transl Res* 11(11):6860–6876
- Zhou X, Zhang Z, Liang X (2020) Regulatory network analysis to reveal important miRNAs and genes in non-small cell lung cancer. *Cell J* 21(4):459. <https://doi.org/10.22074/cellj.2020.6281>
- Zong D, Liu X, Li J, Ouyang R, Chen P (2019) The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. *Epigenetics Chromatin* 12(1):65. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0311-8>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

11. OŚWIADCZENIA



mgr farm. Lias Sead

Łódź, 4.01.2022 r.

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota

Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

OŚWIADCZENIE współautorów określające ich wkład w powstanie monografii

Oświadczam, że mój udział w pracy: Lias Saed, Ewa Olechnowicz, Ewa Balcerczak, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Znaczenie białek HMGA1, HMGA2 i HMGB1 oraz ich genów w raku płuca. UMedical Reports 2021. 3. Łódź. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ISBN 978-83-961774-4-5 przedstawia się jak poniżej:

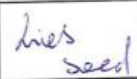
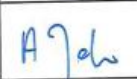

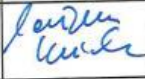
Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Lias Sead	50	przegląd i wybór piśmiennictwa, przygotowanie i korekta manuskryptu	
Ewa Olechnowicz	5	przegląd i wybór piśmiennictwa, przygotowanie manuskryptu	
Ewa Balcerczak	10	opracowanie koncepcji monografii, korekta manuskryptu	
Marek Mirowski	3	korekta manuskryptu	
Aleksandra Sałagacka-Kubiak	32	opracowanie koncepcji monografii, przygotowanie i korekta manuskryptu	

mgr farm. Lias Sead

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota
**Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

OŚWIADCZENIE
współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu

Oświadczam, że mój udział w pracy: Lias Saed, Agnieszka Jeleń, Marek Mirowski, Aleksandra Sałagacka-Kubiak. Prognostic Significance of *HMGAI* Expression in Lung Cancer Based on Bioinformatics Analysis. International Journal of Molecular Sciences 2022, 23, (13):6933. doi: 10.3390/ijms23136933. PMID: 35805937, PMCID: PMC9266824 przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Lias Sead	49	opracowanie koncepcji badań, wybór narzędzi badawczych, wykonanie analiz, przygotowanie i korekta manuskryptu	
Agnieszka Jeleń	3	korekta manuskryptu	
Marek Mirowski	3	korekta manuskryptu	
Aleksandra Sałagacka-Kubiak	45	opracowanie koncepcji badań, pomoc w wyborze narzędzi badawczych i wykonaniu analiz, korekta manuskryptu	

prof. dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota

Przewodnicząca Rady Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

OŚWIADCZENIE
współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu

Oświadczam, że mój udział w pracy: Lias Saed, Ewa Balcerczak, Mariusz Lochowski, Ewa Olechnowicz, Aleksandra Sałagaćka-Kubiak, *HMGAI* gene expression level in cancer tissue and blood samples of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients: preliminary report, *Molecular Genetics and Genomics* 2022, doi: 10.1007/s00438-022-01936-9, PMID: 35948739 przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Lias Saed	45	wykonanie części badań, przygotowanie i korekta manuskryptu	Lias Saed
Ewa Balcerczak	20	opracowanie koncepcji badań, nadzór nad przeprowadzeniem badań, korekta manuskryptu	Ewa Balcerczak
Mariusz Lochowski	10	kolekcjonowanie materiału biologicznego i danych klinicznych	Mariusz Lochowski
Ewa Olechnowicz	5	wykonanie części badań	Ewa Olechnowicz
Aleksandra Sałagaćka-Kubiak	20	nadzór nad przeprowadzeniem badań, opracowanie statystyczne wyników, przygotowanie i korekta manuskryptu	Aleksandra Sałagaćka-Kubiak