

Streszczenie

Rak endometrium to nowotwór narządu rodnych kobiet rozwijający się w błonie śluzowej trzonu macicy. W Polsce rak endometrium jest czwartym pod względem zachorowalności nowotworem u kobiet. Raka endometrium diagnozuje się przeważnie u kobiet w okresie około i pomenopauzalnym, u których często występuje otyłość, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca.

Istotną rolę w rozwoju i progresji wielu nowotworów, w tym raka endometrium odgrywa szlak kinazy AKT. Zwiększona aktywność tego szlaku w raku endometrium wynika z mutacji w genach kodujących receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, 3-kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K lub izoform samej kinazy AKT. Jednak ważną rolę w regulacji aktywności kinazy AKT odgrywają również fosfatazy, które pośrednio (PTEN) lub bezpośrednio (PP2A, PHLPP1, PHLPP2) wpływają na jej defosforylację. Sugeruje się, że na regulację szlaku AKT może wpływać również białko BMI-1, będące składnikiem kompleksu represyjnego PRC1, który wpływa na zahamowanie ekspresji wielu genów. Białko BMI-1 regulując ekspresję genów wpływa na szereg procesów komórkowych takich jak cykl komórkowy, apoptoza, proliferacja, naprawa DNA oraz przejście epitelialno-mezenchymalne. Zaburzenia w aktywności lub ekspresji białka BMI-1 w komórkach nowotworowych może prowadzić do zwiększonej migracji, proliferacji i inwazji komórek. Wynik badań wykazują, że zarówno zwiększona ekspresja, jak i obniżona ekspresja białka BMI-1 wpływa na progresję nowotworów. Rola białka BMI-1 w nowotworach endometrium nie jest dobrze poznana. Ostatnie badania sugerują, że białko BMI-1 może mieć istotny związek z insulinoopornością i regulacją szlaku insuliny w komórkach wątroby. Z kolei dane epidemiologiczne wskazują, że otyłość i zwiększone stężenie insuliny we krwi wynikające z insulinooporności są poważnymi czynnikami ryzyka raka endometrium.

Głównym celem prezentowanej pracy było określenie roli białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w raku endometrium oraz jego wpływu na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek. W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe raka endometrium (HEC-1A oraz Ishikawa) różniące się ekspresją białka PTEN oraz materiał kliniczny obejmujący preparaty tkanki prawidłowej endometrium oraz preparaty raka błony śluzowej trzonu macicy. Aby zrealizować postawiony cel zastosowano szereg metod badawczych. Ekspresję BMI-1 zahamowano w komórkach raka endometrium poprzez interferencję RNA oraz poprzez zastosowanie inhibitora PTC-209. Ekspresję genów oznaczano na poziomie mRNA przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą produktu w czasie rzeczywistym a

zmiany ilościowe białek oznaczono przy użyciu metody Western blotting. W celu oceny migracji komórek zastosowano test wound-healing i Transwell assay. Ocenę potencjału inwazyjnego komórek wykonano przy pomocy insertów opłaszczonych Matrigelem. Ocenę żywotności i potencjału proliferacyjnego komórek określono przez zastosowanie testu MTT. W celu określenia lokalizacji białka BMI1 w miejscach promotorowych badanych genów zastosowano immunoprecypitację chromatyny.

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych miały na celu określenie wpływu zmian ekspresji BMI-1 na fosforylację kinazy AKT i ekspresję fosfataz regulujących aktywność tej kinazy w warunkach różnego stężenia glukozy i stymulacji insuliną oraz wpływu na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek. Uzyskane wyniki wykazały, że w komórkach raka endometrium BMI-1 może wpływać na fosforylację AKT poprzez bezpośrednią regulację ekspresji genów PTEN, PHLPP1 i PHLPP2. Ekspresja BMI-1 jest zależna od stężenia glukozy i insuliny głównie w komórkach wykazujących ekspresję PTEN. W warunkach hiperglikemii BMI-1 może wpływać na aktywność AKT poprzez regulację fosfataz PHLPP 1 i 2, natomiast w warunkach hipoglikemii w komórkach wykazujących ekspresję PTEN głównie przez regulację tej fosfatazy. BMI-1 wpływa na proliferację oraz migrację i inwazję komórek raka endometrium. Wpływ BMI-1 na potencjał migracyjny komórek raka endometrium może być wynikiem regulacji ekspresji genów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym, takich jak SNAIL, SLUG i CDH1.

W celu dalszego potwierdzenia zależności pomiędzy BMI-1 a elementami szlaku AKT w raku endometrium dokonano analizy ekspresji BMI-1, PTEN, PHLPP1/2, AKT i poziomu fosforylowanej formy kinazy AKT, zarówno w preparatach tkanki prawidłowej endometrium, jak i nowotworów endometrium. Uzyskane wyniki dla preparatów nowotworowych analizowano również pod kątem zależności wysokości ekspresji BMI-1 od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO, stopnia histologicznej złośliwości oraz zajęcia węzłów chłonnych. Wykazano, że zmniejszenie ekspresji BMI-1 i poziomu fosforylacji kinazy AKT jest charakterystyczne dla zaawansowanego stadium nowotworu endometrium. Ponadto, w preparatach prawidłowego endometrium obserwuje się znaczącą odwrotną korelację pomiędzy ekspresją BMI-1 a ekspresją fosfataz PHLPP, szczególnie PHLPP1. W przypadku nowotworów korelacja taka obserwowana jest tylko w preparatach wykazujących ekspresję PTEN.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że BMI-1 może odgrywać rolę czynnika, który łączy hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem i progresją raka endometrium poprzez

regulację AKT, a jego działanie zależy od kontekstu molekularnego przede wszystkim ekspresji funkcjonalnej fosfatazy PTEN.

Agnieszka Lauzek

Summary

Endometrial cancer is a cancer of the reproductive organs of women developing in the lining of the uterus. It is the fourth most frequently occurring *malignancy* among *women* in Poland. Endometrial cancer is diagnosed mostly in postmenopausal women who often are obese and suffer from hypertension and diabetes.

AKT kinase pathway plays an important role in cancers development and progression, including endometrial cancer. Increased activity of this pathway in endometrial cancer is a result of mutations in genes encoding receptor tyrosine kinases, PI3K kinase and AKT isoforms. However, crucial role in AKT regulation is played by phosphatases that directly (PTEN) or indirectly (PP2A, PHLPP1, PHLPP2) dephosphorylate AKT. Moreover, it is suggested that BMI-1 protein, that is a component of Polycomb repressive complex PRC1 and inhibits the expression of many genes, is also responsible for AKT pathway regulation. BMI-1 protein is involved in many cellular processes such as cell cycle progression, apoptosis, proliferation, DNA repair and epithelial to mesenchymal transition. Alterations in the activity or expression of BMI-1 in cancer cells lead to increased proliferation, migration and invasion of cells. The results of many studies have shown that both under- and overexpression of BMI-1 impact on cancer progression. The role of BMI-1 in endometrial cancer is not well understood. Recent studies suggest, that BMI-1 shows a significant relationship with insulin resistance and regulation of insulin pathway. Epidemiological data indicate that obesity and hyperinsulinemia resulting from insulin resistance are serious risk factors of endometrial cancer.

The main aim of the study was to determine the role of BMI-1 in AKT pathway regulation in endometrial cancer and its impact on cell migration and invasion potential. Two cell lines of endometrial cancer (HEC-1A and Ishikawa) differing in PTEN protein expression as well as clinical material including samples of normal endometrial tissue and endometrial cancer were used in this study. To achieve the main aim, a number of research methods were used. BMI-1 expression was inhibited in endometrial cancer cells by RNA interference and by the use of a PTC-209 inhibitor. Gene expression was determined using polymerase chain reaction with real-time product analysis and protein level was determined using Western blotting method. To assess cell migration, wound-healing and Transwell assay were used. The invasive potential of the cells was assessed using Matrigel-coated inserts. The assessment of cell viability and proliferative potential was done by using the MTT test. Chromatin

immunoprecipitation was used to determine the localization of BMI-1 protein at promoter sites of the genes tested.

The aim of studies conducted using cell lines was to determine the impact of BMI-1 expression changes on AKT phosphorylation and expression of phosphatases regulating AKT kinase activity in different glucose availability and insulin stimulation conditions. Moreover, the impact of decreased BMI-1 expression on migration and invasion potential of endometrial cancer cells was determined. The results showed that in endometrial cancer cells BMI-1 may impact on AKT phosphorylation by direct regulation of PTEN, PHLPP1 and PHLPP2 gene expression regulation. Expression of BMI-1 is dependent on glucose availability and insulin stimulation mostly in PTEN positive cells. In hyperglycemia conditions BMI-1 affects AKT activity mostly by regulation of PHLPPs and in hypoglycemia conditions by PTEN expression regulation. Analyses showed that BMI-1 has influence on the migration and invasion potential of endometrial cancer cells. The impact of BMI-1 on migration and invasion of endometrial cancer cells may result from the regulation of expression of genes associated with epithelial-mesenchymal transition, such as SNAIL, SLUG and CDH1.

In order to further confirm the relationship between BMI-1 and elements of the AKT pathway in endometrial cancer, the expressions of BMI-1, PTEN, PHLPPs, AKT and phosphorylated form of AKT were analyzed in both normal and endometrial cancer samples. It has been shown that a decrease in BMI-1 expression and AKT kinase phosphorylation is characteristic of advanced stage endometrial cancer. In addition, a significant inverse correlation between BMI-1 expression and PHLPP phosphatase expression, particularly PHLPP1, is observed in normal endometrial samples. In the case of tumors, inverse correlation between BMI-1 and PHLPPs is observed only in cancers expressing PTEN.

The results of the studies suggest that BMI-1 may play the role of a factor that combines hyperglycemia and insulin resistance with the development and progression of endometrial cancer via AKT pathway regulation, and its action depends on the molecular context, especially functional PTEN phosphatase expression status.

Agnieszka Lackek