

Streszczenie

Rak błony śluzowej trzonu macicy to najczęściej występujący nowotwór ginekologiczny u kobiet. Pod względem zachorowalności i śmiertelności zajmuje odpowiednio 4 i 6 miejsce wśród nowotworów u kobiet w Polsce. Rak endometrium jest diagnozowany w okresie około i pomenopauzalnym, jednak coraz częściej dotyka młodsze kobiety. Ze względu na różną skuteczność kliniczną chemioterapii stosowanych w leczeniu raka endometrium, poszukuje się nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na procesy komórkowe związane z przeżyciem komórek i opornością na stosowaną terapię.

Autofagia to wewnątrzkomórkowy mechanizm degradacji, w którym uszkodzone lub przestarzałe organelle, pojedyncze białka lub agregaty są degradowane przez lizosomy. Końcowe produkty rozkładu są wykorzystywane do produkcji energii lub syntezy nowych struktur. Uważa się, że zaburzenia autofagii mogą odgrywać istotną rolę w nowotworach choć rola autofagii w procesie nowotworzenia jest niejednoznaczna. Uważa się, że z jednej strony zapobiega ona transformacji nowotworowej, ale z drugiej promuje wzrost guza. Ostatnie badania wskazują na potencjalną rolę kompleksów represyjnych Polycomb w regulacji autofagii. Kompleks PRC1, w skład którego wchodzi białka BMI-1 oraz RING1A i RING1B, posiada aktywność ligazy ubikwitynowej E3, która odpowiada za ubikwitynylację lizyny 119 histonu H2A. Znaczenie białek BMI-1 oraz RING1A/B w kontekście autofagii jest słabo poznane.

Głównym celem prezentowanej pracy było określenie wpływu białek BMI-1, RING1A i RING1B na proces autofagii oraz określenie efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów białek kompleksu PRC1 w kombinacji z innymi modulatorami autofagii w komórkach raka endometrium HEC-1A i Ishikawa.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wyciszenie ekspresji genów kodujących BMI-1 oraz RING1A/B, wpływa na zmianę ekspresji genów zaangażowanych w proces autofagii w obu liniach komórkowych. Ponadto zaobserwowano, że wyciszenie ekspresji któregoś z genów kodujących białka RING1A, RING1B lub BMI-1 wpływa na ekspresję innych genów Polycomb, co może szczególnie w odniesieniu do RING1A i RING1B sugerować funkcjonalną redundancję.

W celu określenia wpływu białek kompleksu PRC1 na proces autofagii w komórkach hodowanych w warunkach różnej dostępności glukozy, zastosowano inhibitor PRT4165, hamujący katalityczną aktywność RING1A/B oraz PTC-209, będący inhibitorem ekspresji BMI-1. Wykazano, że ekspresja genów zaangażowanych w proces autofagii jest zależna od stężenia glukozy. W komórkach Ishikawa po zastosowaniu inhibitora aktywności

RING1A/B indukowana była autofagia o czym świadczył wzrost ilości białek markerowych dla tego procesu, czego nie obserwowano jednak w komórkach HEC-1A. Inhibitory białek kompleksu PRC1 wykazują większy wpływ na zmiany ekspresji genów zaangażowanych w proces autofagii w komórkach hodowanych w wysokim stężeniu glukozy niż w komórkach hodowanych w warunkach hipoglikemii. Analiza poziomu ubikwitynylacji histonu H2A po wyciszeniu ekspresji/zahamowaniu aktywności białek kompleksu PRC1 wykazała widoczny spadek przede wszystkim w komórkach Ishikawa.

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu inhibitorów białek PRC1 stosowanych pojedynczo lub w kombinacji z modulatorami autofagii na żywotność komórek, a także ocena ich wpływu w połączeniu z inhibitorami autofagii na apoptozę i nekroptozę. Stwierdzono, że zastosowanie inhibitorów kompleksu PRC1 zmniejsza żywotność komórek raka endometrium, przy czym komórki Ishikawa są zdecydowanie bardziej wrażliwe na stosowane inhibitory, o czym świadczyło dużo niższe stężenie związków niezbędne do uzyskania 50% spadku żywotności. Wykazano, że stosowanie inhibitorów kompleksu PRC1 przy jednoczesnym stosowaniu aktywatorów (metformina i Torin1) i inhibitorów autofagii (hydroksychlorochina i Lys05) w większości przypadków wskazuje na ich działanie antagonistyczne. Ocena wpływu inhibitorów PRC1 na apoptozę przeprowadzona z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wskazuje na wzrost odsetka komórek apoptotycznych w przypadku linii HEC-1A. Analiza ekspresji białek związanych z procesami apoptozy i nekroptozy wykazała, że PRT4165 przyczynia się do apoptozy komórek HEC-1A, ale nie komórek Ishikawa, w których obserwuje się przede wszystkim wzrost ekspresji białek związanych z procesem nekroptozy. Stosowanie kombinacji inhibitorów kompleksu PRC1 z inhibitorem autofagii nie zwiększa ich skuteczności działania w indukcji apoptozy/nekroptozy.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na znaczenie białek kompleksu PRC1 w procesie autofagii i apoptozy w komórkach raka endometrium, jednak ich wpływ jest zależny od rodzaju komórek. Zahamowanie aktywności RING1A/B wpływa na indukcję autofagii tylko w komórkach Ishikawa, ale nie indukuje procesu apoptozy, natomiast w komórkach HEC-1A wpływa na indukcję apoptozy. Nie stwierdzono wzrostu efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów kompleksu PRC1 w połączeniu z innymi modulatorami autofagii, co sugeruje, że takie połączenie nie stanowi obiecującej strategii przeciwnowotworowej i należy poszukiwać dalszych potencjalnie skuteczniejszych kombinacji związków.

Aleksandra Szustka

Abstract

Endometrial cancer is the most common gynecological malignancy in women. In terms of morbidity and mortality, it occupies the 4th and 6th place, respectively, among women's cancers in Poland. Endometrial cancer is diagnosed during and postmenopause, but it is increasingly affecting younger women. Due to the different clinical effectiveness of chemotherapies used in the treatment of endometrial cancer, new therapeutic strategies are sought to target cellular processes related to cell survival and resistance to the therapy used. Autophagy is an intracellular degradation mechanism in which damaged or obsolete organelles, single proteins, or aggregates are degraded by lysosomes. The end products of decomposition are used to produce energy or synthesize new structures. It is suggested that alterations of autophagy may play an important role in cancer, although the carcinogenesis role of autophagy in the process is ambiguous. It is believed that on the one hand it prevents neoplastic transformation, but on the other it promotes tumor growth. Recent studies indicate a potential role for Polycomb repressive complexes in the regulation of autophagy. The PRC1 complex, which includes the proteins BMI-1 and RING1A and RING1B, has the activity of E3 ubiquitin ligase, which is responsible for the ubiquitination of lysine 119 of histone H2A. The importance of BMI-1 and RING1A/B proteins in the context of autophagy is poorly understood.

The main objective of the presented study was to determine the effect of the BMI-1, RING1A, and RING1B proteins on the autophagy process and to determine the anticancer effectiveness of the inhibitors of the PRC1 complex protein in combination with other autophagy modulators in HEC-1A and Ishikawa endometrial cancer cells.

As a result of the conducted research, it was found that silencing the expression of genes encoding BMI-1 and RING1A/B affects the change in the expression of genes involved in the autophagy process in both cell lines. In addition, it was observed that silencing the expression of any of the genes encoding the RING1A, RING1B or BMI-1 proteins affects the expression of other Polycomb genes, which may suggest functional redundancy, especially in relation to RING1A and RING1B.

To determine the effect of the PRC1 complex on the autophagy process in cells cultured under conditions of different glucose availability, the inhibitor PRT4165, which inhibits the catalytic activity of RING1A/B, and PTC-209, which is an inhibitor of BMI-1 expression, were used. The expression of genes involved in the autophagy process has been shown to depend on glucose concentration. In Ishikawa cells, after using the RING1A/B activity inhibitor, autophagy was induced, as evidenced by the increase in the amount of marker

proteins for this process, which was not observed in HEC-1A cells. Inhibitors of the PRC1 complex proteins have a greater effect on changes in the expression of genes involved in the autophagy process in cells cultured in high glucose concentration than in cells cultured under hypoglycemic conditions. Analysis of the level of histone H2A ubiquitinylation after silencing/inhibiting the activity of the PRC1 complex proteins showed a noticeable decrease primarily in Ishikawa cells.

The next stage of the research was to determine the effect of PRC1 protein inhibitors used alone or in combination with autophagy modulators on cell viability, as well as to evaluate their effect in combination with autophagy inhibitors on apoptosis and necroptosis. It was found that the use of PRC1 complex inhibitors reduces the viability of endometrial cancer cells, while Ishikawa cells are definitely more sensitive to inhibitors, as evidenced by the much lower concentration of compounds necessary to obtain a 50% decrease in viability. The use of PRC1 complex inhibitors with the concomitant use of activators (metformin and Torin1) and autophagy inhibitors (hydroxychloroquine and Lys05) in most cases has been shown to indicate their antagonistic effect. Evaluation of the effect of PRC1 inhibitors on apoptosis by flow cytometry showed an increase in the percentage of apoptotic cells in the HEC-1A line. Analysis of the expression of proteins associated with apoptosis and necroptosis showed that PRT4165 contributes to apoptosis of HEC-1A cells, but not Ishikawa cells, where an increase in the expression of proteins associated with necroptosis is observed. The use of a combination of PRC1 complex inhibitors with an autophagy inhibitor does not increase their effectiveness in inducing apoptosis/necroptosis.

The results of the studies indicate the importance of the PRC1 complex proteins in the process of autophagy and apoptosis in endometrial cancer cells, but their influence depends on the type of cells. Inhibition of RING1A/B activity affects autophagy induction only in Ishikawa cells, but does not induce apoptosis, while in HEC-1A cells it induces apoptosis. No increase in anticancer efficacy of PRC1 complex inhibitors was found in combination with other autophagy modulators, suggesting that such a combination is not a promising anticancer strategy and further potentially more effective combinations of compounds should be sought.

Aleksandra Szustka