

Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Aleksandra Szustka

Udział białek Polycomb w regulacji procesu autofagii w komórkach raka endometrium

Role of Polycomb proteins in regulation of autophagy
in endometrial cancer cells

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Cytobiochemii
Instytutu Biochemii

pod kierunkiem
dr hab. Anny Krześlak



Łódź, 2022

Składam serdeczne podziękowania

*Promotorowi niniejszej rozprawy doktorskiej dr hab. Annie Krześlak, prof. UŁ
za opiekę naukową, cenne wskazówki, wsparcie i życzliwą atmosferę.*

*Pracownikom i doktorantom Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego
za okazaną pomoc i przyjazną atmosferę.*

*Pracownikom Pracowni Cytometrii
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego
za przeprowadzone analizy będące częścią niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*dr Agnieszce Zaczek
za pomoc i radosną atmosferę podczas długich godzin spędzanych w laboratorium.*

*Pracę dedykuję moim najbliższym, których wsparcie i wyrozumiałość w dużej mierze
przyczyniły się do powstania niniejszej pracy doktorskiej.*

Badania, których wyniki przedstawiono w poniższej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na projekt:

- „Wpływ zahamowania aktywności kompleksu Polycomb PRC1 na proces autofagii w komórkach raka endometrium i piersi” (2018/31/N/NZ5/01046), Preludium 16, 2019 – 2023,

oraz we wsparciu finansowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznany przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w ramach dotacji na działalność polegającą na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na projekty:

- „Wpływ zahamowania ekspresji genu *BMI1* na ekspresję genów związanych z procesem autofagii w komórkach raka endometrium”, B1811000001807.02, 2018;
- „Wpływ zahamowania ekspresji białka BMI-1 na ekspresję genów związanych z procesem autofagii oraz proliferację komórek raka endometrium” B1911000002117.02, 2019.



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	1
Wstęp	6
1. Autofagia – charakterystyka procesu	7
1.1. Rodzaje autofagii	8
1.2. Mechanizm molekularny autofagii	8
1.3. Ścieżki sygnałowe kontrolujące autofagię.....	11
1.4. Rola autofagii w procesie nowotworzenia.....	12
1.4.1. Autofagia jako supresor transformacji nowotworowej.....	13
1.4.2. Autofagia jako promotor transformacji nowotworowej	14
2. Struktura i funkcja kompleksu represyjnego Polycomb 1	15
2.1. BMI-1	17
2.2. RING1A i RING1B	18
2.3. Udział białek kompleksu PRC1 w procesie autofagii	20
3. Autofagia a terapie przeciwnowotworowe	21
3.1. Rapamycyna i jej analogi – inhibitory szlaku mTOR	22
3.2. Metformina – aktywator szlaku AMPK	23
3.3. Inhibitory autofagii jako potencjalne związki stosowane w terapiach przeciwnowotworowych.....	24
3.3.1. Inhibitory wczesnego etapu autofagii	25
3.3.2. Inhibitory późnego etapu autofagii	26
4. Cel pracy.....	28
5. Materiał	29
5.1. Linie komórkowe raka błony śluzowej trzonu macicy	29
6. Metody.....	30
6.1. Hodowla komórek	30
6.2. Zmniejszenie ekspresji RING1A, RING1B i BMI-1 metodą interferencji RNA	30

6.3. Traktowanie komórek inhibitorami	31
6.4. Izolowanie RNA	31
6.5. Spektrofotometryczna analiza czystości RNA	32
6.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji	32
6.7. Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real Time PCR)	33
6.8. Otrzymywanie lizatu komórkowego.....	34
6.9. Western blotting.....	34
6.9.1. Elektroforeza.....	34
6.9.2. Transfer białek na membranę Immobilonu-P	34
6.9.3. Immunodetekcja białek	35
6.10. Usuwanie przeciwciał z membrany w celu ponownej detekcji	37
6.11. Analiza ilościowa białka metodą Lowry’ego	37
6.12. Ocena żywotności komórek testem MTT	38
6.13. Wyliczanie współczynnika CI	38
6.14. Cytometria przepływowa.....	39
6.15. Analiza wyników	40
7. Wyniki	41
7.1. Wpływ wyciszenia/zahamowania aktywności RING1A i RING1B oraz stężenia glukozy na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii	41
7.2. Wpływ wyciszenia/zahamowania aktywności BMI-1 i stężenia glukozy na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii	51
7.3. Określenie poziomu ubikwitynylacji histonu H2A w komórkach z zahamowaną ekspresją/aktywnością RING1A/B i BMI-1	56
7.4. Określenie wpływu zahamowania aktywności RING1A/B i BMI-1 pojedynczo lub w kombinacji z induktorami autofagii na żywotność komórek.....	59
7.5. Określenie wpływu zahamowania aktywności RING1A/B i BMI-1 pojedynczo lub w kombinacji z inhibitorami autofagii na żywotność komórek	63

7.6. Określenie wpływu zahamowania aktywności RING1A/B i BMI-1 w kombinacji z Lys05 na apoptozę i nekroptozę	67
8. Dyskusja	73
9. Podsumowanie	82
10. Wnioski.....	83
11. Streszczenie	84
12. Abstract	86
13. Bibliografia.....	88
14. Dorobek naukowy.....	115

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

AKT	(ang. <i>protein kinase B</i> , PKB) białkowa kinaza serynowo-treoninowa
AMBRA1	(ang. <i>activating molecule in beclin 1-regulated autophagy protein 1</i>) białko aktywujące w procesie autofagii regulowanym przez beclinę 1
AMPK	(ang. <i>AMP-activated protein kinase</i>) kinaza aktywowana przez AMP
ATCC	(ang. <i>American Type Culture Collection</i>) amerykańska organizacja non profit, która zbiera, przechowuje i dystrybuuje mikroorganizmy i linie komórkowe oraz biopreparaty do badań naukowych
ATG	(ang. <i>AuTophaGy related genes</i>) geny zaangażowane w proces autofagii
ATP	(ang. <i>adenosine triphosphate</i>) adenozy-5'-trifosforan
A2780	linia komórkowa raka jajnika
BECN1	(ang. <i>Beclin 1</i>) gen kodujący białko beclinę 1
BMI-1	(ang. <i>B-lymphoma Mo-MLV insertion region-1 homolog</i>) białko kompleksu PRC1
BPH	(ang. <i>benign prostatic hyperplasia</i>) łagodny rozrost gruczołu krokowego
BRAF	(ang. <i>type B rapid accelerated fibrosarcoma</i>) kinaza protoonkogenna
CaMKKβ	(ang. <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase β</i>) zależna od wapnia/kalmoduliny kinaza białkowa β
CBX	(ang. <i>Chromobox</i>) białka Polycomb posiadające chromodomenę
CI	(ang. <i>Combination Index</i>) wartość indeksu kombinacji określający zależność między związkami
CMA	(ang. <i>Chaperone mediated autophagy</i>) autofagia zależna od chaperonów
CML	(ang. <i>chronic myeloid leukemia</i>) przewlekła białaczka szpikowa
c-myc	protoonkogen, czynnik transkrypcyjny
CP20	linia komórkowa raka jajnika
CQ	(ang. <i>chloroquine</i>) chlorochina, inhibitor blokujący fuzję autofagosomu z lizosomami
CRC	(ang. <i>colorectal cancer</i>) rak jelita grubego
C8161	linia komórkowa czerniaka
DDR	(ang. <i>DNA Damage Response</i>) szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA
DU145	linia komórkowa raka prostaty
EC	(ang. <i>endometrial cancer</i>) rak endometrium

ECACC	(ang. <i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>) Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych, dysponująca materiałem pochodzącym z różnych narządów reprezentującym odmienne właściwości
EED	(ang. <i>embryonic ectoderm development</i>) białko wchodzące w skład kompleksu PRC2
EZH2	(ang. <i>enhancer of zeste 12</i>) białko wchodzące w skład kompleksu PRC2 wykazujące aktywność metylotransferazy
FAK	(ang. <i>Focal Adhesion Kinase</i>) kinaza tyrozynowa
FBS	(ang. <i>fetal bovine serum</i>) płodowa surowica bydlęca
FDA	(ang. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>) amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
FIP200	(ang. <i>Focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa</i>) ortolog Atg17 drożdży, białko o masie 200 kDa wchodzące w interakcje z kinazami rodziny FAK
H2A	histon H2A
H2AK119ub	ubikwitynylowana lizyna 119 histonu H2A
H3K27me	metylowana lizyna 27 histonu H3
H3K27	lizyna 27 histonu H3
HCC	(ang. <i>hepatocellular carcinoma</i>) rak wątrobowokomórkowy
HCQ	(ang. <i>hydroxychloroquine</i>) hydroksychlorochina, inhibitor blokujący fuzję autofagosomu z lizosomami
HEC-1A	linia komórkowa raka endometrium
HEPES	kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy, czynnik buforujący
HPV	(ang. <i>Human Papillomavirus</i>) wirus brodawczaka ludzkiego
HTH	(ang. <i>helix-turn-helix</i>) struktura heliks – skręt – heliks
HSC70	(ang. <i>heat shock</i>) białko szoku termicznego o masie 70 kDa
iBMK	(ang. <i>immortalized mouse kidney</i>) unieśmiertelnione komórki myszy
Ishikawa	linia komórkowa raka endometrium
K-Ras	małe białko o aktywności GTP-azy
LAMP-1/2	(ang. <i>Lysosomal associated membrane proteins 1 and 2</i>) białko związane z błoną lizosomalną
LC3	(ang. <i>microtubule-associated protein Light Chain 3</i>) białko zaangażowane w proces autofagii
LKB1	(ang. <i>liver kinase B1</i>) wątrobową kinazą B1
LNCaP	linia komórkowa raka prostaty
LN-229	linia komórkowa glejaka

Lys05	(ang. <i>N</i> -(7-chloroquinolin-4-yl)- <i>N'</i> -[2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl]- <i>N'</i> -methylethane-1,2-diamine trihydrochloride) inhibitor blokujący fuzję autofagosomu z lizosomami
MCF-7	linia komórkowa raka piersi
MDA-MB-231	linia komórkowa raka piersi
MLKL	(ang. <i>mixed lineage kinase domain-like protein</i>) pseudokinaza zaangażowana w proces nekroptozy
MRT67307	inhibitor aktywności kinazy ULK
MRT68921	inhibitor aktywności kinazy ULK
mTOR	(ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>) kinaza serynowo – treoninowa ssaków, której aktywność hamowana jest przez rapamycynę
mTORC1/2	(ang. <i>mammalian target of rapamycin complex 1/2</i>) kompleks 1/2 kinazy mTOR
MTT	bromek 3-(4,5 dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy
NLS1/2	(ang. <i>Nuclear Localization Signal 1 and 2</i>) sygnał lokalizacji jądrowej 1 i 2
NSCLC	(ang. <i>Non-small-cell lung carcinoma</i>) niedrobnokomórkowy nowotwór płuca
NSC185058	inhibitor białka ATG4B
OVACR4	linia komórkowa raka jajnika
p53	(ang. <i>protein 53</i>) białko p53
p62	(ang. <i>protein 62</i>) białko p62
p63	(ang. <i>protein 63</i>) białko p63
PARK2	(ang. <i>parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>) ligaza ubikwitynowa
PARP	(ang. <i>Poly (ADPribose) polymerase</i>) polimeraza poli(ADP-rybozy) zaangażowana w proces apoptozy
PCG	(ang. <i>Polycomb group protein</i>) białka należące do grupy Polycomb
PCGF	(ang. <i>Polycomb group ring finger</i>) białka PCGF
PCOS	(ang. <i>Polycystic ovary syndrome</i>) zespół policystycznych jajników
PDAC	(ang. <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>) gruczolakorak przewodowy trzustki
PE	(ang. <i>phosphatidylethanolamine</i>) fosfatydyloetanolamina
PI	(ang. <i>propidium iodide</i>) jodek propidyny
PINK1	(ang. <i>PTEN induced putative kinase 1</i>) serynowo-treoninowa mitochondrialna kinaza białkowa
PIP3	(ang. <i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>) fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan
PI3K	(ang. <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>) 3-kinaza fosfatydyloinozytolu

PRC1/2	(ang. <i>Polycomb Repressive Complex 1/2</i>) kompleks represyjny Polycomb 1 i 2
PRT4165	(ang. <i>2-(3-pyridinylmethylene)-1H-indene-1,3(2H)-dione</i>) inhibitor aktywności enzymatycznej RING1A/B
PTC-209	(ang. <i>N-(2,6-dibromo-4-methoxyphenyl)-4-(2-methylimidazo [1,2-a]pyrimidin-3-yl)-2-thiazolamine</i>) inhibitor BMI-1
PTEN	(ang. <i>phosphate and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>) białko supresorowe o aktywności fosfatazy
RAD001	Everolimus, analog rapamycyny
RAPA	rapamycyna
RAS	protoonkogen
RAWUL	(ang. <i>Ring-finger and WD40 associated Ubiquitin-Like</i>) C-końcowa domena białka RING1A/B
RBBP4/7	(ang. <i>Retinoblastoma binding protein 4/7</i>) białka wchodzące w skład kompleksu PRC2
RCC	(ang. <i>advanced renal cell carcinoma</i>) rak nerkowokomórkowy
RING1A/B	(ang. <i>Really Interesting New Gene 1A/B</i>) białka kompleksu PRC1 stanowiące jego rdzeń
RNF2	gen kodujący białko RING1B
ROS	(ang. <i>reactive oxygen species</i>) reaktywne formy tlenu
RYBP	(ang. <i>RING1 and YY1 binding protein</i>) białko wchodzące w skład niekanonicznego kompleksu PRC1
SAR405	inhibitor PI3K-III/Vps43
SB02024	inhibitor PI3K-III/Vps43
SBI-0206965	inhibitor aktywności kinazy ULK
Snail	(ang. <i>zinc-finger transcription factors</i>) czynnik transkrypcyjny
SNARE	(ang. <i>soluble N-enhylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor</i>) białko błonowe biorące udział w fuzji pęcherzyków
SQSTM1	(ang. <i>Sequestosome 1</i>) gen kodujący białko p62
SUM159PT	linia komórkowa raka piersi
SUZ12	(ang. <i>suppressor of zeste 12</i>) białko wchodzące w skład kompleksu PRC2
TEM	Temsirolimus, analog rapamycyny
TGFβ	(ang. <i>Transforming growth factor β</i>) szlak sygnałowy transformującego czynnika wzrostu β
TSC2	(ang. <i>tuberous sclerosis complex 2</i>) białko tuberyna
UAMC-2526	inhibitor białka ATG4B
ULK1	(ang. <i>Uncoordinated-51-like kinase 1</i>) kinaza Unc-51 aktywująca autofagię
ULK100	inhibitor aktywności kinazy ULK

ULK101	inhibitor aktywności kinazy ULK
Vps34	(ang. <i>Vacuolar protein sorting 34</i>) ortolog drożdżowy PI3K
Wnt	(ang. <i>Wingless-type like signaling</i>) szlak sygnałowy ogrywający istotną rolę w regulacji takich procesów jak embriogeneza, różnicowanie, przeżywalność i proliferacja komórek
YAF2	(ang. <i>YY1-associated factor 2</i>) białko wchodzące w skład niekanonicznego kompleksu PRC1

Wstęp

Według światowych statystyk epidemiologicznych rak endometrium (ang. *endometrial cancer*, EC) jest szóstym pod względem częstości występowania nowotworem u kobiet. W 2018 roku odnotowano ponad 380 000 nowych przypadków na świecie, co stanowi 4,4% wszystkich zdiagnozowanych w tym roku nowotworów złośliwych kobiet [1]. Najwyższy standaryzowany wiekowo wskaźnik występowania raka endometrium na 100 000 kobiet występuje na Białorusi, a następnie na Wyspach Samoa (odpowiednio 24,9 i 24,8). Polska zajmuje 12 miejsce pod względem zachorowalności na raka endometrium [2]. W ciągu ostatnich 10 lat częstość występowania tego nowotworu wzrosła w wielu regionach geograficznych świata, w tym w Europie [1, 3, 4]. Rak endometrium jest diagnozowany u kobiet w okresie około i pomenopauzalnym, a średnia wieku w momencie rozpoznania wynosi 63 lata, jednakże coraz częściej nowotwór dotyka młodsze kobiety, u których występuje otyłość i hiperinsulinemia [5, 6].

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 [6]. Jednym z takich procesów jest autofagia, której zaburzenia mogą odgrywać istotną rolę w nowotworach choć jej rola w procesie nowotworzenia jest niejednoznaczna. Autofagia przyczyniając się do usuwania zbędnych, uszkodzonych i szkodliwych elementów komórkowych zapobiega powstawaniu nowotworów. Z drugiej jednak strony w zaawansowanych nowotworach narażonych na niedobór składników odżywczych, sprzyja ich przetrwaniu i wzrostowi [7].

Ostatnie badania wskazują, że istotną rolę w regulacji procesu autofagii mogą odgrywać czynniki epigenetyczne, wpływające na ekspresję genów poprzez modyfikacje chemiczne histonów. Jednym z ważnych regulatorów epigenetycznych jest wielobiałkowy kompleks PRC1 (ang. *Polycomb Repressive Complex 1*) odpowiedzialny za zahamowanie ekspresji wielu genów poprzez modyfikacje histonu H2A. Białka BMI-1, RING1A i RING1B są niezbędne do funkcjonowania kompleksu PRC1, który odpowiada za monoubikwitynylację lizyny 119 histonu H2A. Chociaż zarówno RING1A, jak i RING1B są zaangażowane w ubikwitynylację histonu H2A, rola RING1B jest dominująca, a spadek jego aktywności prowadzi do znacznego zmniejszenia ubikwitynylacji H2A [8]. BMI-1 jest najlepiej poznanym składnikiem kompleksu PRC1 i odgrywa istotną rolę w szeregu procesów komórkowych m.in. w proliferacji komórek, unieśmiertelnieniu czy starzeniu [9]. Liczne

badania wskazują wzrost poziomu BMI-1 w wielu typach nowotworów w tym wątroby, prostaty, piersi czy endometrium. Wysoka ekspresja BMI-1 występująca w wielu typach ludzkich nowotworów jest skorelowana z gorszymi rokowaniami u pacjentów i tym samym niepowodzeniem terapii [9]. Ostatnie badania sugerują, że białko BMI-1 może być zaangażowane w zahamowanie autofagii w niektórych nowotworach. Znaczenie pozostałych składników kompleksu PRC1 dla rozwoju i progresji nowotworu jest jeszcze mniej znane, dlatego lepsze zrozumienie działania białek kompleksu PRC1 oraz ich wpływu na autofagię w nowotworach ma kluczowe znaczenie w identyfikacji nowych i skutecznych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych.

1. Autofagia – charakterystyka procesu

Termin autofagia obejmuje szereg ewolucyjnie zachowanych procesów komórkowych, które powodują dostarczenie materiału wewnątrzkomórkowego takiego jak białka i organelle do lizosomów w celu ich degradacji i ponownego użycia produktów powstających w wyniku ich rozkładu [10, 11]. Został on wprowadzony przez Noblistę Christiana de Duve'a w latach 60. XX wieku. Autofagia występuje we wszystkich komórkach zapobiegając akumulacji uszkodzonych elementów komórkowych, odgrywając w ten sposób kluczową rolę w kontroli jakości składników cytoplazmatycznych i utrzymaniu homeostazy komórkowej. Procesy te działają również jako mechanizm przetrwania wykorzystywany przez komórki w warunkach stresowych takich jak głód, niedotlenienie, stres oksydacyjny, infekcje czy brak czynników wzrostu. Podstawowa autofagia jest stosunkowo nieselektywna gdy jest indukowana przez niedobór składników odżywczych czy zaburzenia metaboliczne. Przez długi czas autofagia była uważana przede wszystkim za niespecyficzny proces masowej degradacji, jednak od tego czasu odkryto, że może również wyraźnie rozpoznawać i celować w określone elementy komórkowe – białka, agregaty, rybosomy, organelle w tym mitochondrium i retikulum endoplazmatyczne oraz inwazyjne patogeny [12]. Podobnie jak autofagia nieselektywna, autofagia selektywna zachodzi konstytutywnie i może być indukowana w odpowiedzi na określone warunki. Oprócz utrzymywania homeostazy komórkowej, autofagia pełni również szereg krytycznych funkcji w różnicowaniu i rozwoju komórek, homeostazie tkanek, przeciwdziałaniu starzeniu się i odporności [13]. Biorąc pod uwagę znaczenie autofagii, nie jest zaskakujące, że zaburzenie procesu związane jest z wieloma schorzeniami występującymi u człowieka w tym z chorobami nowotworowymi, neurodegeneracyjnymi, zakaźnymi i układu krążenia [10].

1.1. Rodzaje autofagii

Wyróżnia się trzy typy degradacji zależnej od lizosomów: mikroautofagia, autofagia zależna od chaperonów (CMA, ang. *Chaperone Mediated Autophagy*) i makroautofagia, różniące się od siebie charakterem ładunku i sposobem jego dostarczenia do lizosomów [14].

W mikroautofagii błona lizosomu owija i pochłania część cytozolu wraz z elementami komórkowymi – kluczowym punktem jest to, że wychwyt ładunku zachodzi bezpośrednio na powierzchni lizosomów, bez pośredniego autofagosomu [15]. Obecnie identyfikuje się wiele rodzajów procesów mikroautofagicznych, których mechanizmy różnią się od siebie. Znane funkcje mikroautofagii obejmują kontrolę jakości białek, przebudowę organeli i adaptację w warunkach stresu, natomiast jej rola w chorobach człowieka pozostaje niejasna. [10, 16]

CMA jest formą selektywnej autofagii, która również bezpośrednio dotyczy ładunków cytozolowych, ale w tym przypadku substraty ograniczają się do pojedynczych białek. Białka zawierające motyw pentapeptydowy KFERQ mogą być rozpoznawane przez chaperon HSPA8 znany również jako białko szoku termicznego HSC70 (ang. *heat shock*), a następnie kierowane do lizosomu poprzez wiązanie z LAMP2A (ang. *lysosomal associated membrane protein 2A*) [10, 17]. Autofagia zależna od chaperonów odgrywa różne role fizjologiczne, a badania nad regulacją CMA powiązały ją z różnymi chorobami człowieka w tym chorobami neurodegeneracyjnymi, zaburzeniami metabolicznymi i nowotworami [17, 18].

Najbardziej powszechną formą autofagii jest makroautofagia (nazywana autofagią), która obejmuje tworzenie *de novo* struktur o podwójnej błonie zwanych fagoforami, dojrzewających do autofagosomów. Transportują one ładunek do organeli odpowiadających za ich rozkład – lizosomów lub wakuoli u roślin [10]. Proces autofagii jest realizowany i ściśle regulowany przez produkty białkowe genów *ATG* (ang. *AuTophagy related genes*) [19].

1.2. Mechanizm molekularny autofagii

Proces autofagii można podzielić na cztery etapy: inicjacja i tworzenie fagoforu, wydłużanie fagoforu i jego zamknięcie w celu utworzenia autofagosomu, fuzja autofagosomu z lizosomem, degradacja elementów komórkowych przez enzymy lizosomalne (**Ryc. 1**). Indukcja autofagii zależy od dostępności składników odżywczych takich jak glukoza czy

aminokwasy, a także obecności insuliny lub czynników wzrostu. Wszystkie te elementy oddziałują przez szlak sygnalizacyjny kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*). W komórkach ssaków kinaza mTOR wchodzi w skład dwóch kompleksów – mTORC1 oraz mTORC2. mTORC1 odpowiada za syntezę białek i wzrost komórek. Działając jak swoisty sensor, kontroluje formowanie fagoforu i hamuje inicjację autofagii poprzez fosforylację białek kompleksu inicjacyjnego [14].

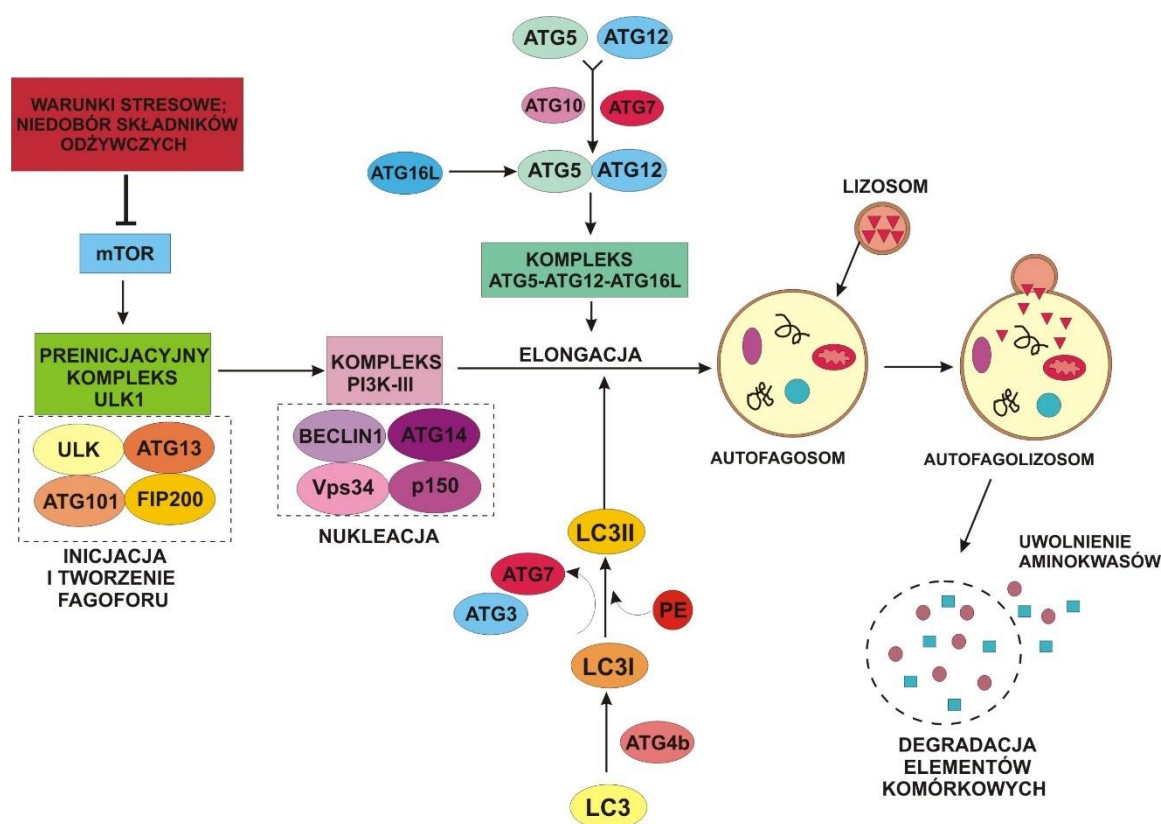
Podczas niedoboru składników odżywczych, aktywność mTORC1 spada, czego następstwem jest defosforylacja i tym samym aktywacja kompleksu ULK1 (ang. *Uncoordinated-51-like kinase 1*). Następnie ULK1 fosforyluje białka ATG13 i FIP200 (ang. *Focal adhesion kinase family interacting protein of 200kDa*; ortolog drożdży Atg17), a także oddziałuje z ATG101, razem formując kompleks ULK odpowiedzialny za inicjację tworzenia fagoforu [20, 21]. W proces nukleacji zaangażowana jest 3-kinaza fosfatydylinozytolu (ang. *Phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) określana jako Vps34 (ang. *Vacuolar protein sorting 34*). Aktywowana przez Vps15 kinaza PI3K w połączeniu z Bclina-1 tworzy kompleks odpowiedzialny za przekształcenie fosfatydylinozytolo-4,5-difosforanu do fosfatydylinozytolo-3,4,5-trifosforanu (ang. *Phosphatidylinositol 3-phosphate*, PIP3). Poprzez interakcję z ATG14, Vps34 kieruje kompleks do powstającej błony autofagosomalnej dzięki czemu możliwe jest jej formowanie [22, 23].

W elongację fagoforu i przekształceniu go w autofagosom są zaangażowane dwa kompleksy białek – kompleks ATG12-5-16L oraz LC3 (ssaczy ortolog Atg8). Pierwszy z nich wymaga obecności czterech białek: ATG7, ATG10, ATG5 i ATG12. ATG7 pełniące rolę enzymu typu E1 aktywuje glicynę na C-końcowym odcinku białka ATG12. Następnie przy udziale ATG10 pełniącym rolę podobną do enzymu typu E2, ATG12 zostaje nieodwracalnie sprzężone z ATG5 poprzez połączenie glicyny z C-końca ATG12 z lizyną 149 w ATG5. W kolejnym etapie powstały koniugat łączy się z białkiem ATG16L (ortolog drożdży Atg16) tworząc kompleks ATG12-5-16L, niezbędny do wydłużania fagoforu i utworzenia autofagosomu. LC3 (ang. *Light Chain 3*; ssaczy ortolog Atg8) to drugi kompleks zaangażowany w wydłużanie fagoforu. Białko LC3 jest obecne w cytozolu i syntetyzowane jako nieaktywna forma pro-LC3. Do powstania aktywnej formy LC3-I dochodzi w wyniku cięcia proteolitycznego na jego C-końcu przez proteazę cysteinową ATG4B [23, 24]. Przekształcenie LC3-I do dojrzałej formy LC3-II odbywa się przy udziale ATG7 (funkcja enzymu E1) i ATG3 (funkcja enzymu E2), a także w wyniku odwracalnego sprzęgania

z fosfatydyloetanolaminą (PE). Białko LC3-II znajduje się zarówno w zewnętrznej, jak i wewnętrznej błonie autofagosomalnej i jest odpowiedzialne za jej elongację [23].

Po zakończeniu tworzenia się autofagosomów zachodzi proces dojrzewania, w którym autofagosomy mogą natychmiast łączyć się z lizosomami tworząc autofagolizosomy. Dokowanie i fuzję autofagosomów z lizosomami ułatwiają białka związane z błoną lizosomu LAMP-1 i LAMP-2 (ang. *lysosomal associated membrane proteins 1 and 2*) oraz białka SNARE [26]. Oba białka LAMP przyczyniają się do fuzji lizosomu, jednak dominującą rolę może odgrywać LAMP-2, gdyż jego niedobór ma bardziej niekorzystne skutki niż niedobór LAMP-1 [27–29].

Ostatnim etapem procesu jest degradacja organelli komórkowych oraz elementów cytoplazmy znajdujących się w autofagolizosomie z udziałem enzymów lizosomalnych. Ładunek jest degradowany do podstawowych elementów budulcowych – aminokwasów, kwasów tłuszczowych, które są poddawane recyklingowi i ponownie wykorzystywane przez komórki, umożliwiając im oporność na warunki stresowe oraz przetrwanie [23].



Rycina 1. Mechanizm autofagii

1.3. Ścieżki sygnałowe kontrolujące autofagię

W prawidłowych warunkach fizjologicznych autofagia odpowiada za utrzymanie homeostazy komórkowej [30, 31]. Pod wpływem zaburzeń środowiskowych (niedobór składników odżywczych, stres retikulum endoplazmatycznego czy niedotlenienie), autofagia jest modulowana w celu umożliwienia adaptacji i przeżycia komórek. Za zmiany odpowiedzialnych jest kilka szlaków sygnalizacyjnych: mTOR, AMPK (ang. *AMP-activated protein kinase*), Wnt (ang. *Wingless-type like signaling*) i TGF β (ang. *Transforming growth factor β*) [31–34].

Ssaczy ortolog drożdżowego białka TOR, mTOR, odgrywa kluczową rolę w regulacji autofagii, poprzez wykrywanie stresu wewnątrzkomórkowego oraz stresowych czynników środowiskowych [31, 32]. Jako negatywny regulator autofagii, mTOR integruje poprzedzające sygnały z innych cząsteczek, w tym AMPK i PI3K [32, 35, 36]. mTOR wchodzi w skład dwóch odrębnych kompleksów, kompleksu mTORC1 i mTORC2 [37, 38]. Funkcjonalnie, mTORC1 odpowiada na poziom składników odżywczych, podczas gdy na mTORC2 mają wpływ czynniki wzrostu [37]. Aktywację mTORC2 można również osiągnąć dzięki obecności aminokwasów poprzez sygnalizację PI3K/AKT [39]. W środowisku bogatym w składniki odżywcze aktywna mTOR inaktywuje ULK1 poprzez fosforylację Ser-757 tym samym uniemożliwiając indukcję autofagii [40]. W przypadku niedoboru składników odżywczych lub stresu komórkowego aktywność mTOR spada i dochodzi do inicjacji autofagii [41–46].

Kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK) to kinaza odpowiadająca za homeostazę energetyczną, która indukuje autofagię poprzez kontrolowanie poziomu ATP i AMP [47, 48]. W odpowiedzi na niedobór energetyczny, AMPK jest aktywowana przez zależną od wapnia/kalmoduliny kinazę białkową β (ang. *calcium/calmodulin-dependent protein kinase β* , CaMKK β) i wątrobową kinazę B1 (ang. *liver kinase B1*, LKB1) poprzez fosforylację na reszcie Thr-172 [49–51]. Aktywowany AMPK fosforyluje TSC2 (ang. *tuberous sclerosis complex 2*) i osłabia aktywność mTOR prowadząc do inicjacji autofagii [40, 52, 53]. Co więcej, podwyższone wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia wywołane stresem ER może także promować autofagię poprzez aktywację AMPK [52, 54].

Odnotowano sprzężenie zwrotne pomiędzy mechanizmem autofagii a szlakiem sygnalizacyjnym Wnt/ β -katenina [55]. Wykazano, że β -katenina wpływa na regulację formowania autofagosomów zarówno w warunkach niedoboru jak i dostępu do składników

odżywczych [56]. Wyniki dotychczasowych badań wykazały również, że β -katenina hamuje transkrypcję białka p62 poprzez wiązanie się do czynnika transkrypcyjnego TCF4 [56]. Ponadto β -katenina integrując sygnały wzrostu i czynniki stresu wpływa na skoordynowanie procesu proliferacji i autofagii. W warunkach standardowych poziom autofagii jest niski, co może być związane z tym, że β -katenina wpływa na autofagię hamując ekspresję p62. W warunkach ograniczonego dostępu do składników odżywczych β -katenina umożliwia aktywację autofagii poprzez transkrypcję p62 [56], po czym następuje sprzężenie zwrotne, w wyniku którego podczas procesu autofagii dochodzi do degradacji β -kateniny [56].

Szlak sygnałowy transformującego czynnika wzrostu β (TGF β) reguluje szereg funkcji biologicznych, w tym proliferację, różnicowanie, migrację i adhezję komórek w celu utrzymania homeostazy komórkowej [57]. W kontekście autofagii, TGF β oddziałuje zarówno przez szlak zależny jak i niezależny od białek Smad promując tworzenie autofagosomu i konwersji LC3-I do LC3-II [58–60]. W komórkach raka nerki traktowanych TGF β zaobserwowano zwiększoną ekspresję markerów autofagii, LC3-II i bekliny-1 [61]. Ponadto, aktywacja autofagii może z kolei wzmacniać ekspresję TGF β , tworząc w ten sposób pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego w progresji nowotworu [62, 63].

1.4. Rola autofagii w procesie nowotworzenia

Autofagia to ewolucyjnie zachowany proces utrzymania homeostazy komórkowej. Dzięki recyklingowi makrocząsteczek, a następnie wykorzystaniu ich jako źródła składników odżywczych, autofagia jest ściśle związana z przeżyciem komórek [64]. Jednakże, niekontrolowana i stała aktywacja autofagii może prowadzić do dezintegracji komórki i ostatecznie jej śmierci [65, 66]. Zaburzenia autofagii są związane z wieloma chorobami w tym chorobami neurodegeneracyjnymi [67], chorobami zakaźnymi, nowotworami złośliwymi wątroby, jelita grubego, żołądka, piersi czy jajników [64, 68]. Rola autofagii w procesie nowotworzenia jest niejasna, ponieważ uważa się, że z jednej strony zapobiega ona transformacji nowotworowej, ale z drugiej – promuje wzrost guza. Początkowo uważano, że autofagia odgrywa rolę ochronną przed rozwojem nowotworu. Badania wykazały, że monoalleliczna delekcja genu kodującego beklinę-1 wpływa na inaktywację procesu autofagii w raku piersi, jajnika i prostaty [69–72]. Tym samym wyciągnięto wniosek, że zahamowanie autofagii przyczyniało się do rozwoju nowotworu. Stwierdzono też, że pacjentki z rakiem jajnika z wysoką ekspresją bekliny-1 mają lepsze rokowania, co sugeruje, że autofagia może ograniczać progresję raka [73]. Ponadto zaobserwowano

zmniejszoną ekspresję genów *ATG5*, *ATG7* i bekliny-1 w komórkach raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*, HCC). Warto zaznaczyć, że ekspresja bekliny-1 była znacząco obniżona w komórkach HCC w porównaniu z tkanką niezmienną nienowotworowo [74]. Przeciwnie w przypadku pacjentów z czerniakiem – zaobserwowano wzrost poziomu autofagii określony wzrostem poziomu LC3-II i ilością autofagosomów [75]. W raku jelita grubego (ang. *colorectal cancer*, CRC) ekspresja LC3 w komórkach guza była znacznie wyższa w porównaniu do odpowiadającej tkanki prawidłowej, co wskazywało na zwiększoną aktywność autofagii. Co ważniejsze, ekspresja LC3 korelowała z agresywnością nowotworu sugerując tym samym promowanie nowotworu przez autofagię [76]. Pomimo zmniejszonej ekspresji bekliny-1 w części preparatów raka jelita grubego, nadekspresja bekliny-1 w CRC była istotnie skorelowana z zajęciem węzłów chłonnych i naczyń, a także wysokim stopniem złośliwości histologicznej [77]. W przypadku raka żołądka badacze również uzyskali rozbieżne wyniki w ekspresji bekliny-1. W części preparatów nowotworowych zaobserwowano spadek ekspresji bekliny-1 w porównaniu z tkanką prawidłową, natomiast w większości z nich zaobserwowano jej zwiększoną ekspresję w porównaniu z sąsiadującą tkanką nienowotworową [78, 79]. Podsumowując, sugeruje się równie ważną rolę autofagii w działaniu hamującym, jak i promującym rozwój nowotworów określając jej działanie jako miecz obosieczny (ang. *double-edged sword*) [34].

1.4.1. Autofagia jako supresor transformacji nowotworowej

W warunkach prawidłowych i we wczesnym stadium nowotworu autofagia służy jako tarcza chroniąca komórki przed szkodliwymi bodźcami i złośliwą transformacją. Ograniczając negatywny wpływ reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS), autofagia zapobiega uszkodzeniom DNA i utrzymuje integralność genomu [80]. Podczas niedoboru składników odżywczych autofagia jest indukowana przez produkcję ROS, w szczególności H_2O_2 , który odwracalnie modyfikuje reszty cysteinowe ATG4 poprzez ich utlenianie i tym samym zaburza jego strukturę uniemożliwiając odłączenie lipidów z LC3. Skutkiem tego jest akumulacja lipidowanej formy LC3 i nasilone tworzenie autofagosomów [81]. Hamowanie autofagii sprawia, że unieśmiertelnione komórki nerki myszy (ang. *immortalized mouse kidney*, iBMK) są podatne na mutacje i niestabilność chromosomów, które mogą prowadzić do aneuploidii [80]. Ponadto, komórki iBMK z defektem autofagii, które doświadczają stresu metabolicznego wykazują nagromadzenie p62 wraz z uszkodzonymi mitochondriami i białkami opiekuńczymi ER wskazując na niepowodzenie

w usuwaniu białek. Z kolei akumulacja p62 sprzyja wytwarzaniu ROS i wywołuje uszkodzenie DNA, co ostatecznie przyczynia się do rozwoju nowotworu [82]. W przeciwieństwie do tego, autofagia hamuje powstawanie nowotworów przez eliminację toksycznych mutagenów oraz unikanie akumulacji defektów genetycznych. Mechanizm ten zapobiega również nadmiernemu stanowi zapalnemu, hamując wzrost komórek nowotworowych [68]. Ponadto, zmniejszona autofagia w komórkach raka nerki sprzyja proliferacji komórek, co sugeruje, że autofagia jest wymagana do ograniczenia wzrostu komórek nowotworowych [83].

1.4.2. Autofagia jako promotor transformacji nowotworowej

Podczas rozwoju i ekspansji nowotworu, szybko proliferujące komórki rakowe zwykle napotykają środowisko, w którym brakuje zarówno tlenu, jak i składników odżywczych. Jest to szczególnie obserwowane w środkowych obszarach guza, który często jest słabo unaczyniony. Dlatego, w porównaniu do prawidłowych komórek, komórki nowotworowe muszą przystosować się i mutować, aby poradzić sobie z takimi warunkami, nie tylko po to, aby przetrwać, ale także dalej rosnąć. W 2000 roku naukowcy odkryli, że wiele rodzajów komórek nowotworowych – m.in. raka wątroby, trzustki, żołądka i okrężnicy – w warunkach niedożywania przeżywa znacznie dłużej niż prawidłowe ludzkie fibroblasty [84]. Ponieważ autofagia jest kluczowym procesem komórkowym, który zapewnia przeżycie w warunkach stresu, nie jest zaskakujące, że proces ten ma szczególne znaczenie w przypadku komórek nowotworowych, ponieważ wspiera utrzymanie i wzrost guza. Pionierskie badania sugerujące, że autofagia może sprzyjać przeżyciu komórek nowotworowych przeprowadził zespół E. White w 2006 roku. Badacze odkryli, że autofagia jest znacząco indukowana w komórkach nowotworowych, szczególnie w regionach objętych stresem metabolicznym, w których może hamować powstawanie komórek nekrotycznych i promować przeżycie komórek [85]. Zgodnie z tymi obserwacjami, w 2008 roku, dwie inne grupy odkryły, że LC3, kluczowy marker autofagii, jest podwyższony w nowotworach przewodu pokarmowego [86] i trzustki [87]. Wykazano także, że autofagia jest niezbędna do wzrostu guza gruczolakoraka przewodowego trzustki (ang. *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC), ponieważ po zastosowaniu inhibitora autofagii chlorochiny wzrost guza jest zahamowany [88].

W związku z tym, że autofagia przyczynia się do wzrostu guzów nowotworowych wiele grup badawczych podjęło intensywne badania mające na celu dokładne poznanie

mechanizmu autofagii oraz odpowiedź na pytanie, czy autofagia może być celem terapeutycznym. Wstępne badania koncentrowały się na protoonkogenie RAS, którego mutacje zaobserwowano w 30% nowotworów [89]. Badania przeprowadzone w 2011 roku przez grupę E. White wykazały, że autofagia ułatwia wzrost i przeżycie wielu typów nowotworów wywoływanych przez mutacje w genie *RAS* w tym raka płuc, raka jelita grubego i raka prostaty [90]. Inne badanie dodatkowo wykazało, że autofagia jest wykorzystywana do utrzymania stabilności genomu mitochondrialnego i przyczynia się do prawidłowego funkcjonowania szlaku pentozofosforanowego i cyklu Krebsa [91]. Zjawisko to jest nie tylko ograniczone do nowotworów płuc wywoływanych przez mutację *RAS*, ale potwierdzono to również w przypadku komórek guza płuca indukowanych mutacją V600E w genie *BRAF*, gdzie delecja *ATG7* prowadzi do akumulacji wadliwych mitochondriów i ogólnego zaburzenia metabolizmu [92]. Łącznie obserwacje te wskazują, że utrzymanie prawidłowej homeostazy mitochondriów może być jednym z kluczowych mechanizmów, za pomocą których autofagia wspiera wzrost komórek nowotworowych.

Do niedawna uważano, że autofagia zależy głównie od regulacji szlaków sygnalizacyjnych reagujących na składniki odżywcze. Coraz więcej dowodów wskazuje, że w szybkiej indukcji autofagii pośredniczą procesy zachodzące w cytoplazmie, jednakże procesy zachodzące w jądrze również są bardzo ważne dla trwałej odpowiedzi oraz ekspresji genów zaangażowanych w autofagię [93, 94]. Ekspresja transkrypcyjna danego locus jest w dużej mierze zdeterminowana przez konformację chromatyny: region musi być dostępny dla czynników regulatorowych i maszyny transkrypcyjnej. Uznaje się, że zmiany epigenetyczne ogrywają znaczącą rolę w powstawaniu i progresji guza. Ostatnie badania sugerują, że zmiany epigenetyczne mogą odgrywać rolę w regulacji genów autofagii w nowotworach [94].

2. Struktura i funkcja kompleksu represyjnego Polycomb 1

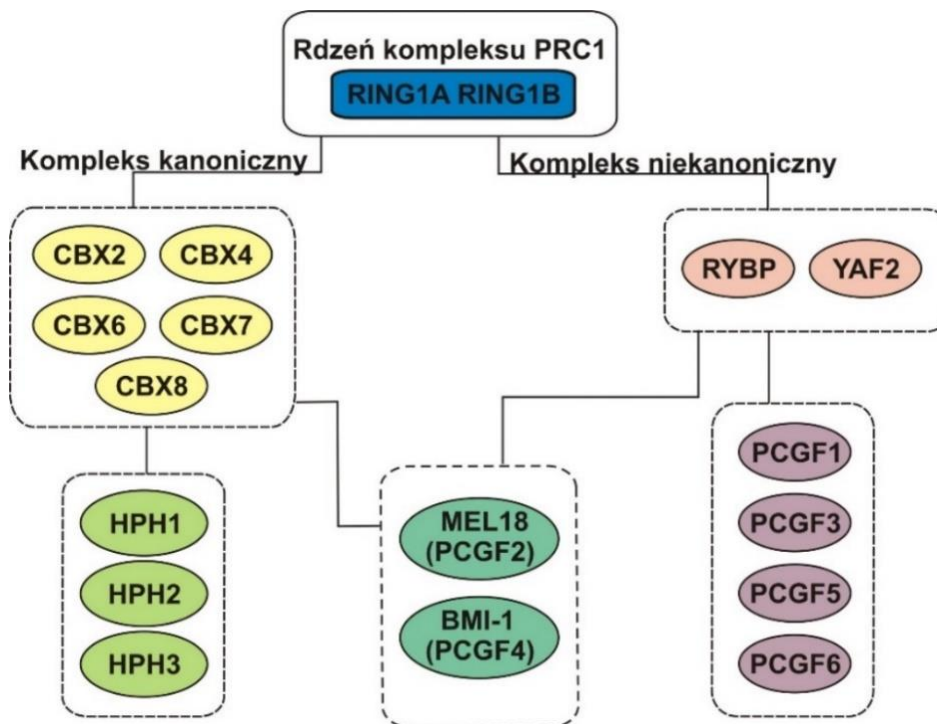
Białka z grupy Polycomb (ang. *Polycomb group protein*, PcG) są dobrze przebadaną grupą modyfikatorów chromatyny, które pierwotnie zidentyfikowano u *Drosophila melanogaster* [95–97]. Od tego czasu wykazano, że są obecne u innych zwierząt, także u ssaków. Białka Polycomb są zazwyczaj podzielone jako należące do jednego z dwóch odrębnych kompleksów wielobiałkowych: kompleksu represyjnego Polycomb 1 i 2 (ang. *Polycomb Repressive Complex 1 and 2*, PRC1 and PRC2) [98, 99]. Kompleksy mają różne aktywności katalityczne, ale oba są związane z wyciszaniem transkrypcji [100]. Poprzez modyfikacje

histonów oba kompleksy Polycomb regulują ekspresję czynników transkrypcyjnych oraz genów kodujących białka szlaków sygnalizacyjnych wpływając tym samym na liczne procesy komórkowe [101]. Zaburzenia w ekspresji i aktywności białek wchodzących w skład kompleksów represyjnych Polycomb mogą doprowadzić do nieprawidłowej regulacji genów kontrolujących podziały, wzrost, apoptozę czy migrację komórek, prowadząc do rozwoju i progresji nowotworów [9].

Kompleks PRC2 jest odpowiedzialny za mono-, di- oraz trimetylację histonu H3 na lizynie 27 (H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3). Aktywność katalityczna PRC2 zależy od trzech podjednostek: EED (ang. *embryonic ectoderm development*), SUZ12 (ang. *suppressor of zeste 12*) oraz wykazującego aktywność metylotransferazy białka EZH2 (ang. *enhancer of zeste 12*) i/lub jego paralogu EZH1 [102 – 104]. Razem z RBBP4 lub RBBP7 (ang. *Retinoblastoma binding protein 4 or RB binding protein 7*) białka te są uważane za podstawowe składniki PRC2 i łączą się z wieloma innymi białkami tworząc nowo zidentyfikowane złożone warianty PRC2 [105].

Kompleks PRC1 posiada aktywność ligazy ubikwitynowej E3, która w komórkach ssaków modyfikuje specyficznie lizynę 119 histonu H2A (H2AK119ub) i odpowiada głównie za jej monoubikwitynylację [106].

W ostatnich latach stało się jasne, że PRC1 nie jest pojedynczym kompleksem, ale co najmniej ośmioma różnymi kompleksami, zdefiniowanymi przez zestaw podjednostek, które nadają różne funkcje biologiczne. Te złożone warianty można dalej klasyfikować jako kanoniczne lub niekanoniczne PRC1, w zależności od tego czy zawierają one białko CBX (ang. *Chromobox*) czy jedno z dwóch homologicznych białek, odpowiednio RYBP (ang. *RING1 and YY1 binding protein*) i YAF2 (ang. *YY1-associated factor 2*) [107]. Zarówno kanoniczne, jak i niekanoniczne PRC1 charakteryzują się obecnością RING1A (ang. *Really Interesting New Gene 1A*) i jego paralogu RING1B, który jest podjednostką odpowiedzialną za katalityczną aktywność PRC1. Kompleksy PRC1 są ponumerowane PRC1.1 – PRC1.6, zgodnie z tym, które z sześciu białek PCGF (ang. *Polycomb group ring finger*) zawierają. Niekanoniczne warianty PRC1 zawierają każde z sześciu białek PCGF, ale MEL18 (znany również jako PCGF2) oraz BMI-1 (znany również jako PCGF4) występują także w kanonicznym kompleksie Polycomb [100, 107, 108] (**Ryc. 3**).



Rycina 2. Budowa kompleksu PRC1 z uwzględnieniem podziału na wariant kanoniczny i niekanoniczny oraz występującymi w nich białkami.

2.1. BMI-1

Białko BMI-1 [ang. *B-lymphoma Mo-MLV insertion region-1 homolog*] jest najlepiej poznanym białkiem kompleksu PRC1 i pełni istotną rolę w wielu procesach, w tym regulacji cyklu komórkowego, odpowiedzi na uszkodzenia DNA, proliferacji i starzeniu komórek oraz nowotworzeniu [109]. BMI-1 jest kodowane przez gen *BMI1* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 10 i składa się 10 eksonów i 9 intronów. Produktem jest białko o masie cząsteczkowej około 37 kDa, zbudowane z 326 aminokwasów [110]. Białko BMI-1 w swojej strukturze zawiera 3 charakterystyczne regiony: centralną domenę HTH (ang. *helix-turn-helix*), N-kończową domenę RING oraz C-kończową domenę PEST (prolina – kwas glutaminowy – seryna – treonina) [110–112]. Domena RING składa się z potrójnie skręconej β -kartki, dwóch pętli wiążących cynk oraz α -helisy [111]. Dzięki domenie RING, BMI-1 może lokalizować się w obrębie pęknięć DNA, co ma kluczowe znaczenie dla jego roli w szlaku odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. *DNA Damage Response*, DDR), natomiast domena HTH ułatwia wiązanie BMI-1 do DNA [113]. Domena PEST jest regionem bogatym w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę, a jego funkcja to kierowanie BMI-1 do degradacji [114]. Oprócz trzech podstawowych funkcjonalnych regionów, białko BMI-1 zawiera również dwa sygnały lokalizacji jądrowej NLS1 i NLS2

(ang. *Nuclear Localization Signal*), jednak tylko utrata NLS2 może znacząco ograniczać lokalizację jądrową BMI-1 [115].

BMI1, jeden z pierwszych genów PcG zidentyfikowanych u ssaków, odkryto w badaniu przesiewowym pod kątem genów współdziałających z protoonkogenem *c-myc* w białaczkach z komórek B i T [116–118]. Ekspresja *BMI1* hamuje częściowo indukowaną *c-myc* apoptozę zależną od $p19^{ARF}$ poprzez hamowanie ekspresji *locus* INK4a/ARF [119].

Coraz więcej dowodów wskazuje, że BMI-1 sprzyja powstawaniu nowotworów. W badaniach przeprowadzonych na modelu mysim niedrobnokomórkowego raka płuca wykazano, że supresja *locus* INK4a-ARF przez BMI-1 jest niezbędna w procesie nowotworzenia indukowanego aktywnością K-Ras [120]. Nadekspresja BMI-1 prowadzi do immortalizacji fibroblastów [121], zwiększa także ekspresję telomerazy wydłużając żywotność komórek nabłonkowych piersi i zwiększając ich potencjał replikacyjny [122]. Wyniki badań wykazały także nadekspresję BMI-1 w komórkach raka jelita grubego [123], rdzeniaku [124], krtani [125], piersi [125], prostaty [127–129], trzustki [130] oraz niedrobnokomórkowym raku płuca [131, 132]. Zwiększony poziom BMI-1 obserwowany jest także we wszystkich pierwotnych białaczkach szpikowych [133] i chłoniakach komórek płaszczka [134]. Co więcej, aktywność onkogeniczna BMI-1 wykazuje powiązanie z aktywnością PTEN (ang. *phosphate and tensin homolog*), dobrze poznanego supresora nowotworowego [135]. Wykazano, że jądrowy PTEN hamuje zdolność BMI-1 do supresji $p16^{INK4}$ i $p19^{ARF}/p14^{ARF}$ oraz indukowania nadekspresji telomerazy w linii komórkowej DU145 raka prostaty [136]. Terapia genowa celująca w BMI-1 może zahamować rozwój chemiooporności nowotworów i poprawia rokowania [112].

2.2. RING1A i RING1B

RING1A i jego paralog RING1B (ang. *Really Interesting New Gene 1A/B*) stanowią rdzeń kompleksu PRC1, pełniąc rolę katalitycznej podjednostki kompleksu. Białko RING1B składa się z 336 aminokwasów i jest kodowane przez gen *RNF2* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 1, a jego region kodujący zawiera 9 eksonów [137]. Białko RING1A jest kodowane przez gen *RING1* zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 6. Region kodujący *RING1* składa się z 7 eksonów, a powstałe białko zawiera 406 aminokwasów [138]. Oba białka mają podobną strukturę, zawierają N-kończową domenę RING dzięki którym mogą tworzyć heterodimery z białkami PCGF oraz C-kończową domenę RAWUL (ang. *Ring-finger and WD40 associated Ubiquitin-Like*) [139–142]. Domeny RAWUL

oddziałują z białkiem CBX lub RYBP (lub jego homologiem YAF2) w sposób wzajemnie wykluczający się [107, 141, 143, 144], podczas gdy każde białko PCGF wydaje się selektywnie oddziaływać ze specyficznymi partnerami wiążącymi, definiując strukturę kompleksu PRC1, a co za tym idzie ich poziom aktywności ubikwitynylacyjnej, a także lokalizację genomową [107, 145].

Chociaż zarówno RING1A jak i RING1B są zaangażowane w monoubikwitynylację histonu H2A, dominującą rolę pełni RING1B, utrata którego prowadzi do znacznego spadku ubikwitynylowanego H2A. Utrata RING1A ma na to tylko niewielki wpływ. BMI-1 pełni funkcję regulującą aktywność ligazy E3 RING1B [8].

Znaczenie komponentów kompleksu PRC1 poza BMI-1 w powstawaniu i progresji nowotworów jest słabiej poznane, ale coraz więcej badań potwierdza ważną rolę RING1B w nowotworzeniu oraz jego wpływ na cechy kliniczno-patologiczne w różnych typach nowotworów. Wyniki badań wykazują podwyższony poziom RING1B w chorobach nowotworowych, a zahamowanie jego ekspresji prowadziło do spadku proliferacji czy indukcji apoptozy [137].

Su i wsp. wykazali, że istnieje statystycznie istotna korelacja pomiędzy nadekspresją RING1B a niską ekspresją p53 w ponad 60% przypadków surowiczych torbieli jajnika i 90% przypadków raka śluzowego jajnika (ovarian mucinous carcinomas). W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem komórek raka jajnika A2780 stwierdzono, że wyciszenie *RNF2* wpływało na zahamowanie proliferacji, jednak w przypadku jednoczesnego wyciszenia *RNF2* i p53 spadek proliferacji nie został zaobserwowany [146].

Bosch i wsp. przy pomocy immunohistochemii określili ekspresję RING1B w 10 próbkach chirurgicznych inwazyjnego raka przewodowego i w 6 tkankach inwazyjnego raka przewodowego piersi. Zaobserwowano umiarkowaną intensywność sygnału barwienia RING1B w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych przewodów sutkowych gdzie sygnał był prawie niewykrywalny. Barwienie immunohistochemiczne RING1B w komórkach, które zaatakowały otaczającą tkankę tłuszczową osiągnęło maksymalną intensywność. Wyniki badań wykazały, że wyciszenie ekspresji *RNF2* z użyciem siRNA w liniach komórkowych raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231 spowodowało spadek poziomu ubikwitynylacji histonu H2A w regionie promotorowym p63 czego skutkiem był wzrost jego ekspresji. p63 wpływa na ekspresję Hsp70, które zapobiega hydrolizie białka FAK przez kaspazę-3. Innymi słowy, RING1B stabilizuje

poziom p-FAK, co prowadzi do zmian fenotypowych wymaganych w procesie imigracji i inwazji komórek nowotworowych zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [147].

Wei i wsp. badali ekspresję RING1B w raku prostaty. Wyniki barwienia immunohistochemicznego w 81 preparatach raka prostaty i 71 preparatach łagodnego rozrostu gruczołu krokowego (ang. *benign prostatic hyperplasia*, BPH) wykazały, że średnio ekspresja RING1B w preparatach raka prostaty była wyższa niż w preparatach BPH. Ponadto stwierdzono, że wyciszenie *RNF2* przez siRNA może skutecznie hamować cykl komórkowy w liniach komórkowych DU145 i LNCaP raka prostaty i indukować apoptozę. Dodatkowo, zaobserwowano znaczące zahamowanie wzrostu ksenograftów raka prostaty z wyciszonym *shRNF2* u bezgrasiczych nagich myszy [148].

Wyniki badań immunohistochemicznych przeprowadzone przez Chen i wsp. wykazały wysoką ekspresję RING1B w komórkach raka przewodu trzustkowego w porównaniu do komórek prawidłowych, gdzie sygnał był słaby lub niewykrywalny. Podobne wyniki uzyskano również w przypadku czynnika transkrypcyjnego Snail. Analiza potwierdziła istnienie dodatniej korelacji między ekspresją Snail a RING1B. Snail odgrywa ważną rolę w regulacji przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz w przerzutach wielu nowotworów. Dalsze badania nad mechanizmem działania wykazały, że Snail może rekrutować RING1B i jego paralog RING1A formując kompleks. EZH2 rekrutuje kompleks Snail-RING1A/B do promotora genu E-kadheryny, który indukuje modyfikację H2AK119Ub1 hamując transkrypcję genu docelowego i promowała przejście epitelialno-mezenchymalne [149].

Udział RING1B zaobserwowano także w innych nowotworach: raku wątrobowokomórkowym [150], czerniaku [151], raku żołądka [152] czy raku urotelialnym pęcherza moczowego [153]. Powyższe badania pokazują, że RING1B uczestniczy w progresji wielu nowotworów co czyni go potencjalnym celem dla terapii nowotworowych.

2.3. Udział białek kompleksu PRC1 w procesie autofagii

Ostatnie doniesienia sugerują, że BMI-1 może być zaangażowane w zahamowanie procesu autofagii w niektórych komórkach nowotworowych.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Dey i wsp. wykazały indukcję procesu autofagii w komórkach raka jajnika OVCAR4 i CP20 z wyciszoną ekspresją *BMI1*. W wyniku transfekcji komórek z użyciem siRNA, a także zahamowaniu ekspresji *BMI1* z wykorzystaniem inhibitora PTC-209 (ang. *N*-(2,6-dibromo-4-methoxyphenyl)-4-(2-

methylimidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)-2-thiazolamine) zaobserwowano formowanie autofagosomów i wzrost poziomu LC3-II z jednoczesnym spadkiem ekspresji *SQSTM1* w obu typach komórek. W wyniku indukcji autofagii dochodzi do aktywacji szlaku mitochondrialnego apoptozy zależnego od PINK1 (ang. *PTEN induced putative kinase 1*) i PARK2 (ang. *parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*) i aktywacji nekroptozy [154].

W liniach komórkowych raka piersi MDA-MB-231 i SUM159PT wyciszenie ekspresji *BMI1* uwrażliwia je na promieniowanie jonizujące, a także prowadzi do aktywacji autofagii z jednoczesnym spadkiem potencjału migracyjnego w porównaniu do komórek kontrolnych. W wyniku wyciszenia *BMI1* z użyciem *shBMI1* i *siBMI1* dochodzi do wzrostu poziomu LC3-II w obu liniach komórkowych. Komórki z wyciszonym *BMI1* poddawano napromieniowaniu, co znacznie wzmacniało proces autofagii [155].

Wu i wsp. przeprowadzili badania na komórkach raka wątroby, w których wyciszano ekspresję *BMI1*, a następnie traktowano 5-fluorouracylem. W wyniku wyciszenia ekspresji *BMI1* dochodziło do wzrostu poziomu bekliny-1 i akumulacji białka LC3-II [156].

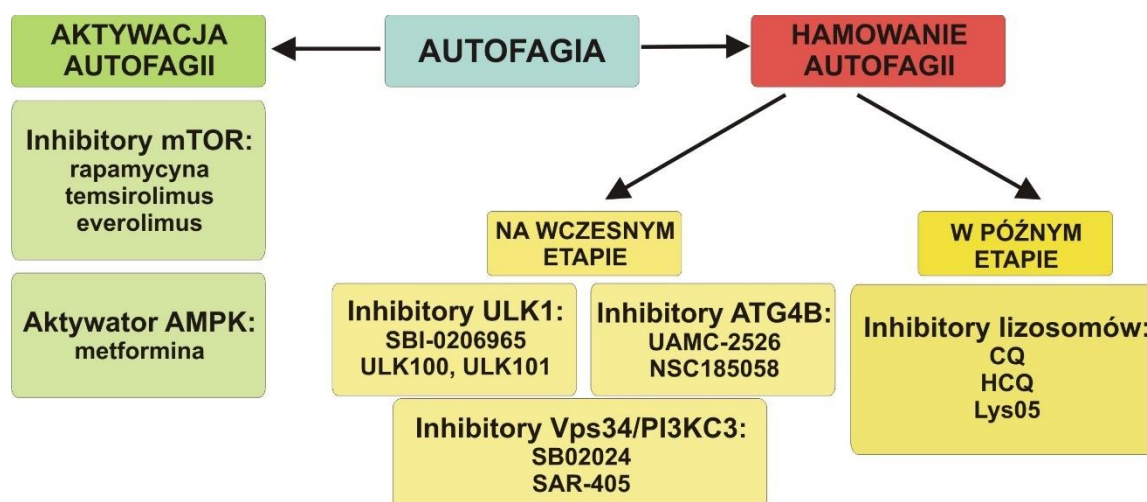
BMI-1 wspiera także proliferację i aktywność klonogenną komórek przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *chronic myeloid leukemia*, CML) poprzez zapobieganie autofagii. Wykorzystując immunoprecypitację chromatyny określono, że *BMI1* działa bezpośrednio na ekspresję genu cykliny G2 (CCNG2). Spadek poziomu BMI-1 w komórkach CD34+ CML uzyskany dzięki PTC-209 lub z użyciem transfekcji *shBMI1* powodowały wzrost ekspresji CCNG2 i zmniejszały aktywność klonogenną [157].

Badania przeprowadzone przez Xia i wsp. wykazały, że RING1B dzięki aktywności ligazy ubikwitynowej E3 może negatywnie wpływać na regulację autofagii poprzez białko AMBRA1 (ang. *activating molecule in beclin 1-regulated autophagy protein 1*), które wchodzi w skład kompleksu PI3K uczestniczącego w formowaniu fagosomów. W warunkach stresu metabolicznego RING1B przyłącza się do kompleksu i rozpoczyna ubikwitynylację białka AMBRA1 w wyniku czego dochodzi do jego degradacji i zatrzymania procesu autofagii [158].

3. Autofagia a terapie przeciwnowotworowe

W ciągu ostatniej dekady autofagia stała się obiecującym celem terapii przeciwnowotworowych [34]. Biorąc pod uwagę jej podwójną rolę na różnych etapach nowotworzenia, nie jest zaskakujące, że zarówno induktory jak i inhibitory są rozpatrywane

jako potencjalne związki przeciwnowotworowe, które mogą podnieść skuteczność środków chemioterapeutycznych [159]. Obecnie kilka modulatorów autofagii zostało zatwierdzonych przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA), a wiele z nich jest w fazie badań klinicznych [160].



Rycina 3. Modulatory autofagii jako potencjalne substancje wykorzystywane w leczeniu nowotworów

3.1. Rapamycyna i jej analogi – inhibitory szlaku mTOR

Rapamycyna (RAPA, Sirolimus) jest antybiotykiem przeciwgrzybiczym wytwarzanym przez *Streptomyces hygroscopicus* [161]. Ten naturalnie występujący inhibitor szlaku sygnalizacyjnego mTOR został pierwotnie zatwierdzony przez FDA jako lek immunosupresyjny [162]. Rapamycyna jest związkiem o szerokim spektrum działania farmakologicznego i biologicznego. Oprócz właściwości przeciwgrzybiczych związek ten wykazuje m.in. właściwości neuroprotektoryjne [163], przeciwnowotworowe [164], przeciwstarzeniowe [165] i immunosupresyjne [166].

Kluczową rolę w regulacji procesu autofagii w komórkach nowotworowych odgrywa sygnalizacja mTOR, która może wpływać na nasilenie ich wzrostu i proliferacji. Przeprowadzone badania wykazywały, że rapamycyna indukuje tworzenie autofagosomów, a na późniejszym etapie ich fuzję z lizosomami [167, 168]. W dalszym ciągu trwają badania kliniczne dotyczące zastosowania RAPA w leczeniu m.in. rozległego guza naczyniowego jamy brzusznej (ang. *Kaposiform hemangioendothelioma*) u dzieci (NCT04077515), raka pęcherza moczowego (NCT02753309, NCT04375813), HER-2 dodatniego wczesnego raka

piersi (NCT04736587) i guzów litych opornych na standardowe terapie (NCT02688881). Trwają również badania oceniające zastosowanie sirolimusu w kombinacji z durvalumabem w leczeniu pacjentów z niedrobnokomórkowym nowotworem płuc (ang. *Non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC) (NCT04348292 i sirolimusu z terapią metronomiczną w leczeniu nawrotowych lub opornych na leczenie nowotworów wieku dziecięcego (NCT02574728) [169].

Temsirolimus (TEM, Torisel®) jest analogiem rapamycyny i został zatwierdzony przez FDA w leczeniu zaawansowanego raka nerkowokomórkowego (ang. *advanced renal cell carcinoma*, RCC) [169]. Prowadzono badania nad potencjalnym zastosowaniem TEM w terapii raka jelita grubego [170], raka prostaty [171], raka płaskonabłonkowego jamy ustnej i gardła związanych z wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. *Human Papillomavirus*, HPV) [172] czy zaawansowanych guzów litych [173]. Ponadto, trwa co najmniej kilkadziesiąt badań klinicznych dotyczących stosowania TEM w leczeniu zaawansowanych lub przerzutowych nowotworów złośliwych (NCT01552434, NCT01529593, NCT01187199), zaawansowanych nowotworów ginekologicznych (NCT01065662, NCT00977574) czy guzów litych u dorosłych (NCT01375829, NCT02389309, NCT02975882).

Everolimus (RAD001) jest kolejnym analogiem rapamycyny i po raz pierwszy został zatwierdzony przez FDA jako środek terapeutyczny w leczeniu zaawansowanego raka nerki [169]. Od tego czasu stale poszukuje się nowych zastosowań leku w leczeniu nowotworów. W poprzednich latach zbadano możliwość zastosowania RAD001 w terapii łączonej (everolimus i bevacizumab) w zaawansowanym raku nerkowokomórkowym typu brodawkowatego [174], w leczeniu potrójnie ujemnego raka piersi (everolimus i gefinitib) [175] czy w terapii zaawansowanych guzów litych (everolimus i vatalanib) [176]. Obecnie prowadzone są także badania kliniczne dotyczące zastosowania RAD001 w leczeniu nawracającego lub postępującego wyściółczaka u dzieci (NCT02155920), chłoniaka Hodgkina (NCT03697408), przerzutowego raka przejściowokomórkowego nabłonka dróg moczowych (NCT00805129) czy raka piersi (NCT03154281).

3.2. Metformina – aktywator szlaku AMPK

Metformina została odkryta w 1992 roku jako produkt uboczny syntezy N,N-dimetyloguanidyny [177]. W wyniku licznych badań udowodniono hipoglikemiczne działanie metforminy tym samym wykorzystując ją do leczenia cukrzycy [178]. Obecnie jest

najczęściej przepisywanym lekiem przeciwcukrzycowym stosowanym w leczeniu cukrzycy typu 2, zwłaszcza u cukrzyków cierpiących na otyłość [179, 180].

Metformina może indukować spadek proliferacji komórek poprzez aktywację szlaku AMPK, prowadząc do zahamowania szlaku mTOR, a w konsekwencji do aktywacji apoptozy lub zatrzymania cyklu komórkowego. Dodatkowo aktywacja AMPK promuje również inicjację autofagii poprzez bezpośrednią fosforylację ULK1 i równoległe zahamowanie mTORC1 poprzez fosforylację TSC2 i Raptor [40].

Tomic i wsp. stwierdzili, że metformina znacząco wpływa na proliferację komórek czerniaka hamując wzrost guza. Ponadto, analiza próbek guza wykazała, że lek zwiększa poziom markerów apoptotycznych w komórkach nowotworowych i indukuje proces autofagii [181]. W 2014 roku Takahashi i wsp. uzyskali podobne wyniki podczas badań na linii komórkowej raka endometrium Ishikawa [182].

W ostatnich latach prowadzono intensywne badania nad nowymi właściwościami metforminy, m.in. w leczeniu zespołu policystycznych jajników (ang. *Polycystic ovary syndrome*, PCOS) [183, 184], w terapii przeciwnowotworowej [185] lub jako inhibitora procesu starzenia [186, 187]. Obecnie prowadzone są badania kliniczne nad zastosowaniem metforminy w leczeniu raka piersi (NCT04559308, NCT04387630, NCT01980823, NCT04741204), raka okrężnicy (NCT03359681) czy raka prostaty (NCT02176161, NCT02339168).

3.3. Inhibitory autofagii jako potencjalne związki stosowane w terapiach przeciwnowotworowych

Jak odnotowano wcześniej, rola autofagii w nowotworach jest dwojaka. Coraz więcej dowodów wskazuje, że autofagia umożliwia przeżycie różnym komórkom nowotworowym, dlatego poszukuje się związków hamujących ten proces i jednocześnie posiadających właściwości przeciwnowotworowe. Poszczególne etapy procesu – inicjacja procesu przez kompleks ULK1, nukleacja fagoforu przez kompleks PI3K, wydłużanie fagoforu, fuzja autofagosomu z lizosomem – stanowią odrębne cele w potencjalnej terapii. Z tego względu inhibitory autofagii klasyfikuje się jako działające na wczesne etapy autofagii: inhibitory ULK1, Vps34 i ATG4B oraz inhibitory późnej autofagii, na które składają się głównie inhibitory lizosomów.

3.3.1. Inhibitory wczesnego etapu autofagii

Kinaza serynowo-treoninowa ULK1 jest jednym z głównych regulatorów wczesnego etapu autofagii. Ze względu na jej podwyższony poziom w wielu nowotworach stanowi możliwy cel terapii przeciwnowotworowej [159, 188]. Zidentyfikowano wiele związków zaangażowanych w hamowanie aktywności kinazy ULK m.in. MRT68921, MRT67307, ULK-100, ULK-101, jednak najlepiej zbadanym selektywnym inhibitorem jest SBI-0206965 [189, 190]. W kilku niezależnych badaniach wykazano, że SBI-0206965 sprzyja supresji guza. W niedrobnokomórkowym nowotworze płuc ULK1 promuje przeżywalność komórek poprzez modulowanie zarówno autofagii jak i apoptozy, a zahamowanie jej aktywności przez inhibitor uwrażliwia komórki NSCSC na cisplatynę [191]. Co ciekawe, oprócz zahamowania ULK1, SBI-0206965 blokuje również aktywność AMPK, a w połączeniu z inhibitorami mTOR dochodzi do znacznego zwiększenia śmiertelności komórek nowotworowych [192]. W glejaku podwyższony poziom autofagii w wyniku wysokiej aktywności AMPK i ULK1 sprzyja oporności na terapię temozolomidem, jednak kombinacja SBI-0206965 z wysoką dawką temozolomidu sprzyja indukcji apoptozy [193]. Podobny efekt obserwuje się w komórkach raka jasnokomórkowego nerki, gdzie zahamowanie procesu autofagii w wyniku spadku aktywności ULK1 indukuje apoptozę [194].

Ze względu na udział w nukleacji fagoforów, zahamowanie aktywności PI3K-III/Vps34 w terapii antynowotworowej wydaje się kluczowe, ponieważ jego inhibicja prowadzi do akumulacji substratów autofagii. Inhibitory PI3K-III/Vps43, SAR405 i SB02024 dały obiecujące wyniki w badaniach na nowotworowych liniach komórkowych. SB02024 jako potencjalny inhibitor autofagii wykazuje działanie synergistyczne z innymi terapiami. Wykazano, że SB02024 zwiększa wrażliwość komórek na sunitynib (terapeutyk zatwierdzony przez FDA w leczeniu raka piersi) w dwóch liniach komórkowych raka piersi – MCF-7 i MDA-MB-231 [195]. SAR405 hamuje aktywność białek Vps43 i Vps18. Badania Pasquier i wsp. wykazały, że hamowanie Vps34 przez SAR405 prowadzi do upośledzenia funkcji lizosomów i zahamowania procesu autofagii. Ponadto, zastosowanie kombinacji SAR405 z everolimusem wykazuje synergistyczne działanie przeciwnowotworowe związków poprzez spadek proliferacji komórek w nowotworze nerki [196]. W 2020 roku Janji i wsp. opublikowali artykuł opisujący zastosowanie inhibitorów Vps34 (SAR405 i SB02024) w komórkach nowotworowych jelita grubego i czerniaka. Na podstawie

uzyskanych wyników doszli do wniosku, że zastosowanie tych związków wzmacnia efekt terapeutyczny zastosowanej immunoterapii anty-PD-1/PD-L1 [197].

Białka ATG są podstawowymi białkami biorącymi udział w inicjacji autofagii i tworzeniu autofagosomu. Ingerowanie w ich działanie stanowi obiecujące podejście mające na celu przeciwdziałanie zwiększeniu aktywności autofagii w komórkach [159]. Kluczowym dla procesu autofagii jest białko ATG4B, które odpowiada za przekształcenie nieaktywnego pro-LC3 do aktywnej formy LC3-I w wyniku cięcia proteolitycznego, umożliwiając jego dalszą konwersję do LC3-II. Inhibitor NSC185058 blokuje aktywność ATG4B, zmniejsza liczbę i wielkość autofagosomów i nie ma wpływu na aktywność innych kinaz takich jak mTOR. Ponadto, NSC185058 hamuje rozwój kostniakomięsaka w warunkach *in vivo* [198]. Związek UAMC-2526 także wykazuje działanie hamujące w stosunku do ATG4B. Hamuje także autofagię u myszy z guzami jelita grubego i zwiększa skuteczność chemioterapii w indukowaniu śmierci komórek zmniejszając wielkość guza [199].

3.3.2. Inhibitory późnego etapu autofagii

Zastosowanie związków blokujących fuzję autofagosomu z lizosomami stanowi prawdopodobnie najlepsze rozwiązanie farmakologiczne wykorzystywane do zahamowania autofagii w celu uzyskania efektów przeciwnowotworowych lub wzmocnienia skuteczności leków przeciwnowotworowych [159]. Wśród nich najczęściej stosowanymi związkami jest chlorochina (ang. *chloroquine*, CQ) i jej pochodna hydroksychlorochina (ang. *hydroxychloroquine*, HCQ), związki zatwierdzone przez FDA i stosowane w leczeniu malarii [169]. Jako słabe zasady CQ i HCQ wnikają do lizosomów i tam wewnątrz organelli ulegają protonowaniu z powodu niskiego pH [200]. Stwarza to niekorzystne środowisko dla enzymów lizosomalnych i tym samym upośledza ich funkcję. Akumulacja protonowanej CQ i HCQ wewnątrz lizosomu prowadzi do zahamowania autofagicznej degradacji ładunku i w konsekwencji do zablokowania przepływu autofagicznego i zatrzymania ostatniego etapu autofagii [201]. Skutkiem tego jest zablokowana zdolność dostarczenia energii do komórki. Związki te są obiecującymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe. CQ i HCQ są jedynymi inhibitorami lizosomów zatwierdzonymi do badań klinicznych nowotworów. Ponieważ długotrwałe stosowanie chlorochiny powodowało poważne skutki uboczne, w badaniach klinicznych najczęściej stosuje się hydroksychlorochinę. Chociaż badania przyniosły obiecujące wyniki, w dużej mierze nadal są jednak niejednoznaczne. Ponieważ hamowanie za pomocą CQ/HCQ blokuje autofagię zarówno w obrębie guza jak i poza nim,

maksymalna tolerowana dawka różni się w zależności od cytotoksyczności leku stosowanego w połączeniu, jak również od typu guza [202, 203]. Ze względu na to ciągle poszukuje się kolejnych związków wykazujących właściwości hamujące aktywność lizosomalną w komórkach.

Lys05 jest nowym inhibitorem lizosomów i wykazuje silniejsze działanie niż CQ i HCQ. McAfee i wsp. porównywali skuteczność HCQ i Lys05 w liniach komórkowych C8161, LN-229 i modelu heteroprzeszczepu 1205Lu. Uzyskane wyniki wykazały 34-krotnie większe stężenie Lys05 w komórkach nowotworowych w porównaniu z HCQ. Ponadto zaobserwowano dwukrotnie większą akumulację pęcherzyków autofagii po aplikacji Lys05 w porównaniu z HCQ [204]. DeVorkin i wsp. wykazali, że podawanie Lys05 razem z sunitynibem (inhibitor receptorowej kinazy tyrozynowej) poprawia działanie leku. W stosowanych modelach heteroprzeszczepu jasnokomórkowego raka jajnika hamowanie procesu autofagii przez Lys05 skutkowało zwiększeniem aktywności przeciwnowotworowej sunitynibu w porównaniu z leczeniem pojedynczym związkiem (sunitynib lub sam Lys05) [205].

4. Cel pracy

Rola autofagii w procesie nowotworzenia jest niejednoznaczna. Z jednej strony autofagia może hamować proces karcynogenezy, natomiast z drugiej, szczególnie na późniejszych etapach, może być odpowiedzialna za progresję i metastazę. Do niedawna uważano, że autofagia zależy przede wszystkim od potranslacyjnej regulacji szlaków związanych z odpowiedzią na dostępność składników odżywczych. Ostatnie badania wskazują jednak, że epigenetyczne czynniki mogą wpływać na proces autofagii. Na przykład indukowanie autofagii przez inhibitory deacetylaz histonów jest uznawane za jedną z ich antynowotworowych właściwości. Białka BMI-1 oraz RING1A/B będące składnikami kompleksu Polycomb PRC1 odgrywają istotną rolę w procesie nowotworzenia, a inhibitory ich aktywności mogą mieć potencjalnie duże znaczenie w terapiach przeciwnowotworowych. Niewiele jednak wiadomo na temat roli tych białek w procesie autofagii. Ponadto, ważnym pytaniem na które wciąż nie ma jednoznacznej odpowiedzi jest czy w kontekście terapii przeciwnowotworowej lepiej jest hamować autofagię, uniemożliwiając komórkom przetrwanie w warunkach niedostatecznej ilości składników odżywczych czy też ją indukować, gdyż autofagosomalne struktury mogą stanowić czynnik indukujący apoptozę lub nekrotozę.

Zatem głównym celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu białek BMI-1 i RING1A/B, będących składnikami kompleksu PRC1 na proces autofagii oraz określenie efektywności przeciwnowotworowej inhibitorów kompleksu PRC1 w kombinacji z innymi modulatorami autofagii w raku endometrium. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych raka endometrium – HEC-1A oraz Ishikawa.

Cele szczegółowe przeprowadzonych badań obejmowały:

- 1) określenie wpływu wyciszenia ekspresji RING1A, RING1B oraz BMI-1 na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii;
- 2) określenie wpływu inhibitorów BMI-1 i RING1A/B poprzez zastosowanie PTC-209 i PRT4165 na ekspresję genów uczestniczących w procesie autofagii w warunkach różnego stężenia glukozy;
- 3) określenie wpływu inhibitorów BMI-1 i RING1A/B stosowanych pojedynczo lub w kombinacji z induktorami lub inhibitorami autofagii na żywotność komórek;

- 4) określenie wpływu inhibitorów białek kompleksu PRC1 stosowanych pojedynczo lub w kombinacji z inhibitorem lizosomów na apoptozę oraz nekroptozę w komórkach raka endometrium.

5. Materiał

5.1. Linie komórkowe raka błony śluzowej trzonu macicy

Do przeprowadzenia badań wykorzystano dwie linie komórkowe raka błony śluzowej trzonu macicy – HEC-1A oraz Ishikawa. Linia komórkowa HEC-1A została kupiona w ATCC (ang. *American Type Culture Collection*), a linia Ishikawa w ECACC (ang. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*).

Charakterystyka linii komórkowych:

HEC-1A – linia komórkowa pochodzi z gruczolakoraka 71-letniej kobiety z nowotworem o średniozaawansowanym stopniu histologicznej złośliwości (G2). W warunkach *in vivo* komórki formują dobrze zróżnicowanego gruczolakoraka endometrium będącego w II stopniu zaawansowania klinicznego. Komórki linii HEC-1A charakteryzują się ekspresją fosfatazy PTEN.

Ishikawa – linia komórkowa wywodzi się z gruczolakoraka 39-letniej kobiety. Linia komórkowa Ishikawa indukuje dobrze zróżnicowanego gruczolakoraka u atymicznych nagich myszy. Komórki Ishikawa charakteryzują się brakiem ekspresji białka PTEN, co wynika z mutacji występującej w tym genie.

6. Metody

6.1. Hodowla komórek

Komórki raka błony śluzowej trzonu macicy HEC-1A i Ishikawa hodowano w warunkach standardowych (temperatura 37°C, wilgotność 95% i atmosfera wzbogacona w 5% CO₂) w podłożu hodowlanym DMEM:F12 (BioWest, Francja), które zawierało 2 mM L-glutaminę, 15 mM HEPES oraz 10% płodową surowicę bydlęcą (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS) w przypadku linii komórkowej HEC-1A oraz 5% FBS dla linii komórkowej Ishikawa. Medium w butelkach hodowlanych zmieniano co 2 dni, a komórki obu linii pasażowano co 4-5 dni w stosunku 1:8 z użyciem roztworu 0,25% trypsyny z 0,02% EDTA (BioWest, Francja).

Komórki wysiewano na 24 godziny przed planowanym eksperymentem. Gęstość wysiewania zależała od rodzaju płytki oraz linii komórkowej, co zostało przedstawione szczegółowo w Tabeli 1.

Tabela 1. Liczba komórek wysiewanych na poszczególne płytki hodowlane.

Rodzaj zastosowanego naczynia hodowlanego	Liczba komórek (ilość komórek na dołek)	
	HEC-1A	Ishikawa
Płytką hodowlaną 6-dółkową	400 000	300 000
Płytką hodowlaną 12-dółkową	200 000	150 000
Płytką hodowlaną 96-dółkową	10 000	8 000

6.2. Zmniejszenie ekspresji RING1A, RING1B i BMI-1 metodą interferencji RNA

Ekspresję genów *RING1*, *RNF2* i *BMI1* wyciszono przy użyciu Silencer® Select siRNA firmy Ambion® (ID: s12035, s12069, s2016) (USA). Kontrolę stanowił Silencer® Select Negativ Control #1 siRNA o sekwencji niehomologicznej do genów człowieka (Ambion®, USA). Transfekcja została przeprowadzona z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen™, USA) zgodnie z dołączonym protokołem.

W pierwszym etapie dla każdego genu przygotowano dwie próbki ze 100 µl medium DMEM:F12 bez surowicy. Do pierwszej próbki dodawano odczynnik Lipofectamine™, a do drugiej siRNA – odpowiednio 30 nM siRNA dla *RING1* i *RNF2* i 45 nM siRNA dla *BMI1*. Po trwającej 5 minut inkubacji, próbki zawierające siRNA przenoszono do próbek zawierających odczynnik do transfekcji i delikatnie mieszano. Powstałą mieszaninę

inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej w celu utworzenia kompleksu, który następnie dodawano do dołków z komórkami. Po 24 godzinach od transfekcji zmieniano medium hodowlane. Efekt interferencji na poziomie mRNA i białka badano po 48 godzinach dla obu linii komórkowych.

6.3. Traktowanie komórek inhibitorami

Aktywność białek RING1A i RING1B została zahamowana przy użyciu inhibitora PRT4165, natomiast translację białka BMI-1 zahamowano z użyciem inhibitora PTC-209. Komórki obu linii wysiewano na płytki hodowlane 6- i 12-dołkowe w gęstości przedstawionej w **Tabeli 1**. Po upływie 24 godzin komórki traktowano PRT4165 w stężeniach 51,6 μM dla linii HEC-1A i 26,9 μM dla linii Ishikawa, oraz PTC-209 w stężeniach 10 μM dla linii HEC-1A i 5 μM dla linii Ishikawa, wybranych na podstawie wcześniejszych badań. Efekt działania związków na poziomie mRNA i białka oceniano po 48 godzinach.

Komórki HEC-1A i Ishikawa wysiewano na 6- i 12-dołkowe płytki hodowlane, a następnie traktowano PRT4165 i PTC-209 w warunkach hipoglikemii (0,5 mM glukoza). Efekt na poziomie mRNA i białka oceniano po 48 godzinach.

Komórki obu linii wysiewano na płytki 6-dołkowe. Po upływie 24 godzinach traktowano odpowiednio:

- PRT4165 i Lys05 pojedynczo w stężeniach równych odpowiednio IC_{50} i IC_{25} dla PRT4165, IC_{25} dla Lys05 oraz w kombinacji;
- PTC-209 i Lys05 pojedynczo w stężeniach równych odpowiednio 10 μM PTC-209 dla HEC-1A i 5 μM PTC-209 dla Ishikawa, stężeniu IC_{50} dla PTC-209, IC_{50} dla Lys05 oraz w kombinacji.

Efekt na poziomie białka oceniano po 48 godzinach.

6.4. Izolowanie RNA

Izolację RNA z zebranych komórek wykonano z użyciem zestawu Tissue Total RNA GBP Mini Kit (GenoPlast Biochemicals, Polska).

W pierwszym etapie osad komórkowy zawieszano w 350 μl buforu do lizy GARB, który zawierał 1% 2-merkaptoetanol i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Uzyskaną mieszaninę przenoszono do kolumny z filtrem umieszczonej w probówce odbierającej i wirowano przy 14 000 rpm przez 2 minuty. Do otrzymanego supernatantu dodawano 350 μl 96% etanolu, dokładnie mieszano, a następnie całość przenoszono na

kolumnę GARB umieszczoną w nowej probówce odbierającej i wirowano przy 14 000 rpm przez 2 minuty. W kolejnym etapie kolumnę przepłukiwano trzykrotnie z wykorzystaniem buforów WASH1 i WASH2. Następnie wypłukane kolumny umieszczano w probówkach do elucji. Na środek każdej z nich dodawano 20 µl wody wolnej od RNAz, inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przy 14 000 rpm przez 2 minuty. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -20°C do przeprowadzania dalszych analiz.

6.5. Spektrofotometryczna analiza czystości RNA

Ocenę czystości wyizolowanego RNA mierzono metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji próbek przy długościach fal 260 nm i 280 nm. Jako wzór czystości RNA przyjęto wartość A_{260}/A_{280} mieszczącą się w granicach 1,8-2,0. Stężenie RNA próbek określono przy pomocy wartości absorbancji przy długości fali 260 nm, korzystając z zależności:

$$c \text{ µg/ml} = A_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{rozcieńczenie}$$

w której wartość 40 µg/ml to stężenie jednoniciowego RNA odpowiadające absorbancji jednostkowej przy długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm.

6.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystywano zestaw High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) stosując się do protokołu dołączonego przez producenta. 2 µg RNA zawieszano w 10 µl wody wolnej od RNAz, a następnie dodawano odpowiednio 2 µl buforu reakcyjnego (10x RT Buffer), 2 µl losowych starterów (10x RT Random Primers), 0,8 µl deoksyrybonukleotydów dNTP (100 mM), 1 µl odwrotnej transkryptazy (MultiScribe Reverse Transcriptase) oraz 4,2 µl wody wolnej od RNAz. Mieszaninę o końcowej objętości 20 µl inkubowano w temperaturze 25°C przez 10 minut, następnie w 37°C przez 120 minut oraz 85°C przez 5 minut. Otrzymane w wyniku reakcji cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

6.7. Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real Time PCR)

Reakcję Real Time PCR przeprowadzono z użyciem komercyjnego buforu reakcyjnego 5x HOT FIREPol® Eva Green® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia) i zaprojektowanych zestawów starterów (Merck, Germany), których sekwencje przedstawiono w Tabeli 2. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły 1 µl cDNA, 2 µl buforu reakcyjnego, 0,25 µl startera F (Forward Primer), 0,25 µl startera R (Reverse Primer) i 6,5 µl wody. Profil termiczny reakcji obejmował denaturację wstępną w temperaturze 95°C przez 12 minut oraz 40 cykli, na które składały się inkubacje w temperaturze 95°C przez 15 sekund, 61°C przez 20 sekund i 72°C przez 20 sekund. Reakcję przeprowadzano w urządzeniu Mastercycler®ep realplex (Eppendorf). Wartości cyklu progowego (C_t , ang. *Copy threshold*) dla poszczególnych próbek przeliczano na liczbę kopii mRNA analizowanych genów przypadającą na 1000 kopii mRNA genu HPRT1 wykorzystując następującą zależność:

$$\Delta C_t = C_t \text{ badanego genu} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

$$L = 1000 \cdot 2^{-\Delta C_t}$$

Tabela 2. Sekwencje nukleotydowe stosowanych starterów

Gen	Sekwencja startera typu forward	Sekwencja startera typu revers
BMI1	AATTAGTTCCAGGGCTTTTCAA	CTTCATCTGCAACCTCTCCTCTAT
RING1	TGCCTCCACAGATTCTGCTC	GCTTCTTTTCGGCAGGTAGGA
RNF2	CGAACACCTCAGGAGGCAAT	TGCCACTTCTAAGGGCTGTG
MAP1LC3	CCAGCCGACCGCTGTAAG	CTTGGTCTTGTCAGGACGG
SQSTM1	CTGTGGTAGGAACCCGCTAC	GGACCCATTTCCCATCCTGG
BECN1	CAAGATCCTGGACCGTGTC	TGGCACTTTCTGTGGACATCA
ATG3	CAGGCATGCTGAGGTGATGA	CGTTAACAGCCATTTTGCCAC
ATG5	CACAAGCAACTCTGGATGGG	ACTGTCCATCTGCAGCCAC
ATG7	TCCGGGGATTTCTTTACGG	CTCATCATCGCTCATGTCCCA
ATG12	TGCTGGAGGGGAAGGACTTA	GTTCGCTCTACTGCCCACTT
HPRT1	CCCTGGCGTCGTGATTAGTG	ACACCCTTTCCAAATCCTCAGC

6.8. Otrzymywanie lizatu komórkowego

Lizę preparatów komórkowych przeprowadzano z wykorzystaniem buforu RIPA (50 mM Tris HCl (pH 8), 1% nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0,5% deoksycholan sodu, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 1 mM PMSF). Po wstępnym zawieszeniu osadów komórkowych w buforze, próbki homogenizowano przez 20 sekund na lodzie przy użyciu sonikatora (Vibra Cell™ model VCX-130, USA). Uzyskane homogenaty wirowano przez 5 minut przy 5000 obr/min w 4°C (wirówka Sorvall™ model ST16R, USA). Otrzymane supernatanty przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

6.9. Western blotting

6.9.1. Elektroforeza

Lizaty komórkowe mieszano w stosunku 2:1 z 0,9 objętościami buforu do rozpuszczania białek (250 mM Tris HCl (pH 6,8), 40% glicerol, 8% SDS, pironina) oraz 0,1 objętości 2-merkaptioetanolu. Otrzymane próbki worteksowano, denaturowano przez 5 minut w 100°C, schładzano, a następnie наносzono na żel.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano z użyciem metody Laemmli (1970) w 8%, 10% i 12,5% żelu poliakrylamidowym (375 mM Tris HCl (pH 8,8) oraz 20% SDS) w płytkach o wymiarach 83 x 100 x 1,5 mm [206]. Próbkę zatężano w 3% żelu zatężającym (125 mM Tris HCl (pH 6,8) oraz 20% SDS). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w układzie: 192 mM glicyna, 25 mM Tris (pH 8,3), 0,1% SDS przy natężeniu prądu 40 mA na płytkę przez około 2 godziny.

6.9.2. Transfer białek na membranę Immobilonu-P

Rozdzielone w żelu poliakrylamidowym białka poddawano elektrotransferowi na membranę Immobilonu-P (o średnicy porów 0,45 µm) według metody Towbina i wsp. (1979) [207]. Transfer przeprowadzano w buforze o składzie 192 mM glicyna, 20% metanol, 25 mM Tris (pH 8,3) w temperaturze 4°C przez około 16 godzin przy stałym napięciu 40 V.

Po zakończonym elektrotransferze białka unieruchomione na membranie Immobilonu-P barwiono w 0,2% roztworze Ponceau S w 3% kwasie octowym w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Nadmiar barwnika odpłukiwano wodą do uzyskania wyraźnych pasm białek, które umożliwiały kontrolę transferu. Widoczne pasma białek odbarwiano przy użyciu roztworu TBST 0,05 M Tris HCl – 0,15 M NaCl – 0,01% Tween 20 pH 7,5 (TBS – 0,01% Tween 20).

6.9.3. Immunodetekcja białek

Na immunodetekcję białek unieruchomionych na membranie Immobilonu-P składały się następujące etapy:

1. Godzinna inkubacja w roztworze TBS – 0,05% Tween 20 (0,05 M Tris HCl – 0,15 M NaCl – 0,05% Tween 20, pH 7,5) celem ograniczenia niespecyficznego wiązania się przeciwciał do membrany Immobilonu-P;
2. Całonocna inkubacja w 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi roztworem TBS – 0,01% Tween 20. Charakterystyka przeciwciał przedstawiona w **Tabeli 3**;
3. Trzykrotne płukanie membrany w 8 ml TBS – 0,01% Tween 20 w celu wypłukania nadmiaru przeciwciał niezwiązanych z antygenem; czas trwania pojedynczego płukania 10 minut;
4. Jednogodzinna inkubacja w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z peroksydazą chrzanu rozcieńczonymi w roztworze TBS – 0,01% Tween 20. Charakterystyka przeciwciał przedstawiona w **Tabeli 3**;
5. Sześciokrotne płukanie membrany w 8 ml roztworu TBS – 0,01% Tween 20 w celu wypłukania nadmiaru przeciwciał niezwiązanych z antygenem; czas trwania pojedynczego płukania 5 minut;
6. Identyfikacja kompleksu antygen – przeciwciało z wykorzystaniem metody chemiluminescencji z użyciem zestawu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermofisher Scientific™, Litwa);
7. Utrwalanie chemiluminescencji membrany wykonywano przez zaciemnienie kliszy rentgenowskiej.

Masa cząsteczkowa oznaczanych białek została określona na podstawie Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermofisher Scientific™, Litwa).

Tabela 3. Charakterystyka stosowanych przeciwciał

Typ przeciwciała	Przeciwciała anty-	Opis przeciwciała	Numer kat.	Producent	Miano
I rządowe przeciwciała	BMI-1	monoklonalne przeciwciała królika klasy IgG	#6964	CST	1:1000
	RING1A		#13069		
	RING1B		#5694		
	LC3A/B		#12741		
	p62		#5114		
	beklina-1		#3495		
	ATG5		#12994		
	ATG7		#8558		
	ATG12		#4180		
	pRIP		#65746		
	RIP		#3493		
	pMLKL		#91689		
	MLKL		#14993		
	ciężta kaspaza-3		#9664		
	kaspaza-3		#14220		
	kaspaza-8		#4790		
	ubikwitynylowany histon H2A		#8240		
	ATG3	poliklonalne przeciwciała królika klasy IgG	#3415		
	ciężta kaspaza-8	monoklonalne	#9748		
	β-aktyna	przeciwciała mysie klasy IgG	sc-47778	SCBT	
II rządowe przeciwciała	kozie przeciwciała poliklonalne		#7074	CST	1:5000
	sprzężone z HRP skierowane przeciwko IgG królika				
	końskie przeciwciała sprzężone z HRP skierowane przeciwko IgG myszy		#7076		

CST – Cell Signaling Technology®, USA; SCBT – Santa Cruz Biotechnology®, USA.

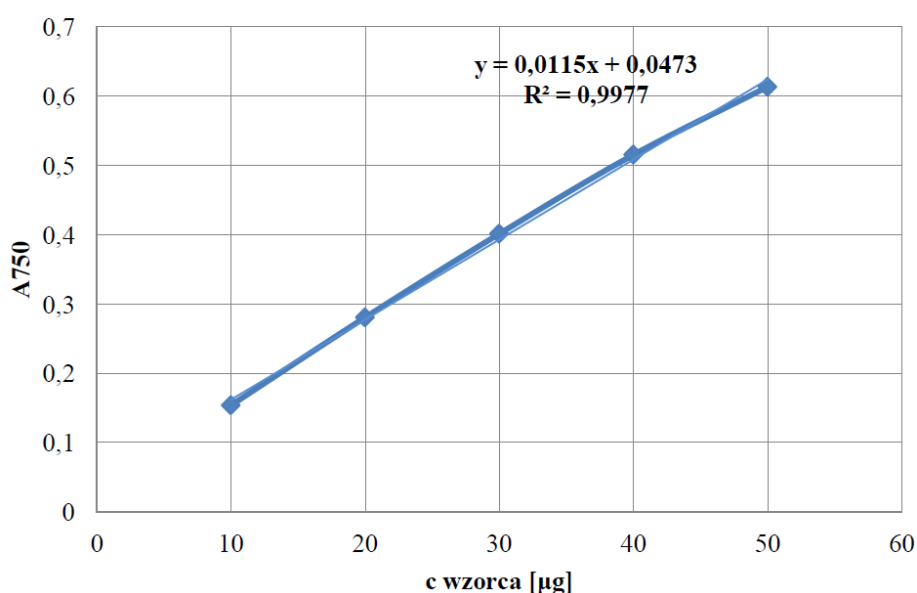
6.10. Usuwanie przeciwciał z membrany w celu ponownej detekcji

W celu usunięcia unieruchomionych na membranie Immobilonu-P przeciwciał związanych ze swoistym antygenem wykonywano dwa 15-minutowe płukania w buforze do strippingu (1,5% glicyna – 0,1% SDS – 1% Tween 20, pH 2,2) ogrzanym do 50°C. W kolejnym etapie membranę płukano dwukrotnie z użyciem roztworu TBS – 0,01% Tween 20, a następnie raz z użyciem roztworu TBS, każde płukanie po 10 minut.

6.11. Analiza ilościowa białka metodą Lowry’ego

Do określania stężenia białka w preparatach komórkowych wykorzystywano zmodyfikowaną metodę Lowry’ego [208].

Do 5 µl badanej próbki dodawano 45 µl wody i 50 µl 1 M NaOH, a następnie całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Po inkubacji, do każdej próbki dodawano 1 ml zasadowego roztworu miedzi (2% winian sodowo-potasowy, 1% roztwór CuSO₄, 2% roztwór Na₂CO₃ w stosunku 1:1:1000, przygotowany 30 minut przed dodaniem). Mieszaninę inkubowano przez 10 minut. W kolejnym etapie do próbek dodawano 100 µl odczynnika Folina – Ciocaltea’u rozcieńczonego z wodą w stosunku 1:1, a następnie worteksowano i poddawano 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej. Absorbancję próbek mierzono w spektrofotetrze UV-Vis Helioß (pye-Unicam) przy długości fali 750 nm. Pomiaru dla poszczególnych próbek standaryzowano względem kontroli odczynnikowych.



Rycina 4. Krzywa wzorcową do oznaczania zawartości białka

6.12. Ocena żywotności komórek testem MTT

Do określenia aktywności metabolicznej komórek traktowanych związkami wykorzystano test MTT (bromek 3-(4,5 dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy). Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości przedstawionej w **Tabeli 1**. Po 24 godzinach komórki traktowano inhibitorami białek kompleksu PRC1, induktorami i inhibitorami autofagii oraz kombinacjami związków, a następnie inkubowano przez 48 godzin. Do każdego dołka dodawano 20 μ l roztworu soli tetrazolowej i umieszczano płytkę w inkubatorze na 4 godziny. Po zakończonej inkubacji usuwano medium i do każdego dołka dodawano 50 μ l dimetylosulfotlenku w celu rozpuszczenia powstałych kryształów formazanu. Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm. Od pojedynczego wyniku odejmowano absorbancję kontroli odczynnikowej. Procent żywych komórek wyliczano przez porównanie wartości absorbancji prób badanych z wartością absorbancji prób kontrolnych (komórki nietraktowane związkami). Absorbancję kontroli przyjmowano jako 1.

6.13. Wyliczanie współczynnika CI

Korzystając z metody Chou-Talalaya wyliczono wskaźnik CI (ang. *Combination Index*), którego wartość określa jak oddziałują na siebie związki w zastosowanych kombinacjach. Przyjmuje się $CI < 0,9$ jako efekt synergistyczny, $CI = 0,9 - 1,1$ jako efekt addytywny oraz $CI > 1,1$ jako efekt antagonistyczny [209, 210]. Dokładne wartości współczynnika CI i odpowiadający im typ oddziaływań przedstawiono w **Tabeli 4**.

Tabela 4. Typy oddziaływań z odpowiadającą im wartością CI.

Wartość CI	Typ oddziaływań
< 0,1	Bardzo silny synergizm
0,1 – 0,3	Silny synergizm
0,3 – 0,7	Synergizm
0,7 – 0,85	Umiarkowany synergizm
0,85 – 0,9	Niewielki synergizm
0,9 – 1,1	Efekt addytywny
1,1 – 1,2	Niewielki antagonizm
1,2 – 1,45	Umiarkowany antagonizm
1,45 – 3,3	Antagonizm
3,3 - 10	Silny antagonizm
> 10	Bardzo silny antagonizm

W celu obliczenia wskaźnika CI wykorzystano poniższy wzór:

$$CI = \frac{\text{stężenie IC50}}{\text{związku w kombinacji}} + \frac{\text{stężenie IC50}}{\text{związku pojedynczo}}$$

Aby określić rodzaj oddziaływań między związkami w zastosowanych kombinacjach wykonano obliczenia wskaźnika CI wykorzystując otrzymane wartości IC₅₀.

6.14. Cytometria przepływowa

Ocenę przeżywalności komórek nowotworowych przeprowadzano po 48 godzinach inkubacji ze związkami. Przeżywalność komórek w próbach kontrolnych i badanych została określona metodą cytometrii przepływowej przy użyciu testu *Vybrant Apoptosis Assay Kit #4*. Zasada testu opiera się na cytometrycznej ocenie wnikanie zielonego barwnika (YO-PRO-1) do komórek apoptotycznych oraz drugiego barwnika fluorescencyjnego – jodku propidyny (PI), który wnika głównie do komórek martwych i znajdujących się w późnej apoptozie.

Po inkubacji komórki zbierano i wirowano przy 300 rpm przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskany osad zawieszano w 0,5 ml PBS z dodatkiem obu barwników (po 0,5 µl każdego barwnika). Tak uzyskane próbki inkubowano przez 15 minut w ciemności,

a następnie dokonywano pomiaru cytometrycznego. Komórki żywe nie wykazywały fluorescencji, komórki martwe barwiły się na zielono, a komórki martwe i w później apoptozie wykazywały zarówno zieloną jak i czerwoną fluorescencję.

6.15. Analiza wyników

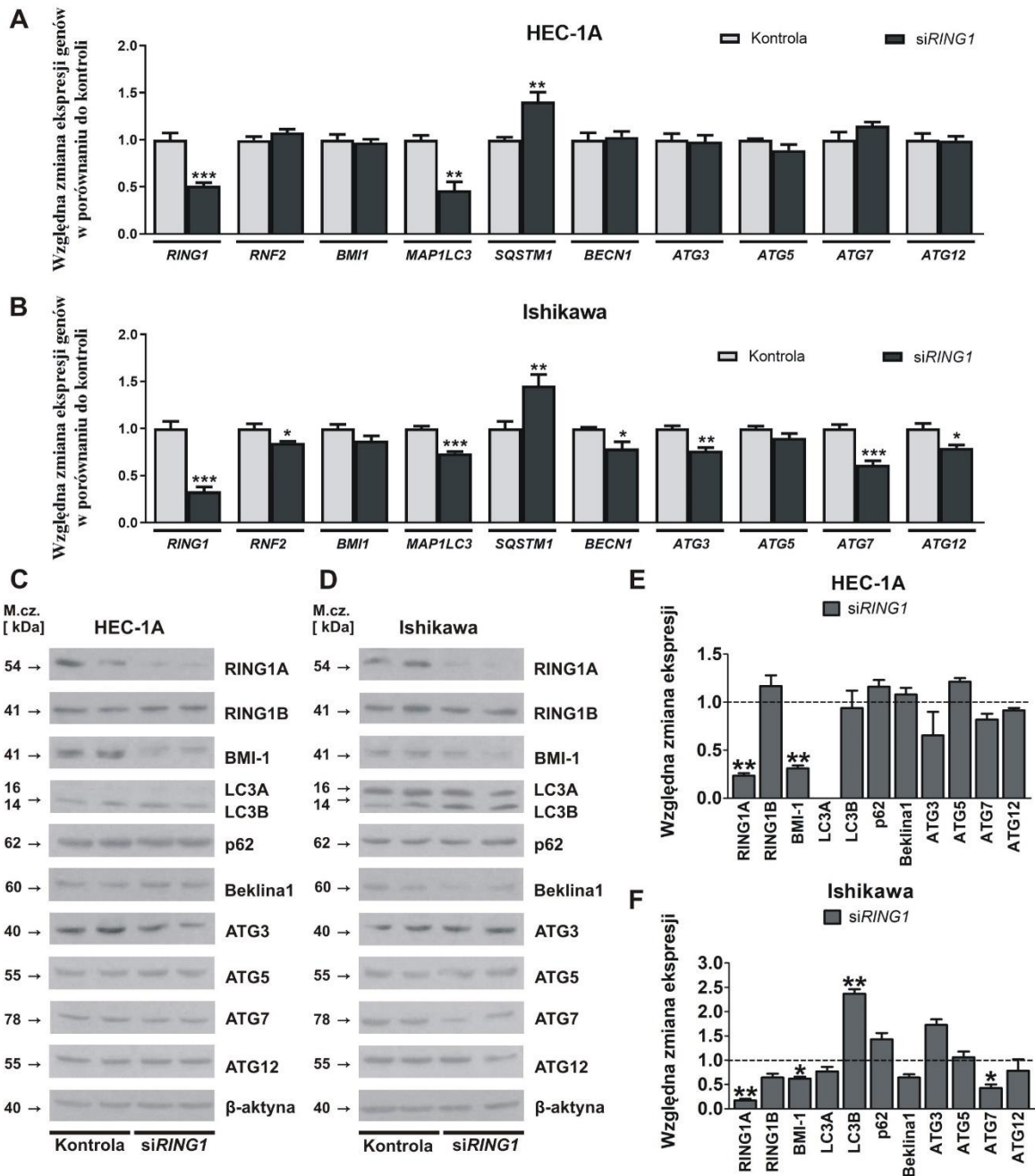
Wyniki badań zostały opracowane w programie statystycznym GraphPad Prism 5. Analiza densytometryczna została przeprowadzona z wykorzystaniem programu Gel Pro 3.0 (Media Cybernetics). W celu porównania różnic między komórkami kontrolnymi i traktowanymi używano testu t-Studenta dla prób niesparowanych. Do porównania badanych grup stosowano test Kruskalla-Wallisa z testem post hoc Dunna. Wartość $p < 0,05$ przyjęto jako istotną statystycznie.

7. Wyniki

7.1. Wpływ wyciszenia/zahamowania aktywności RING1A i RING1B oraz stężenia glukozy na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii

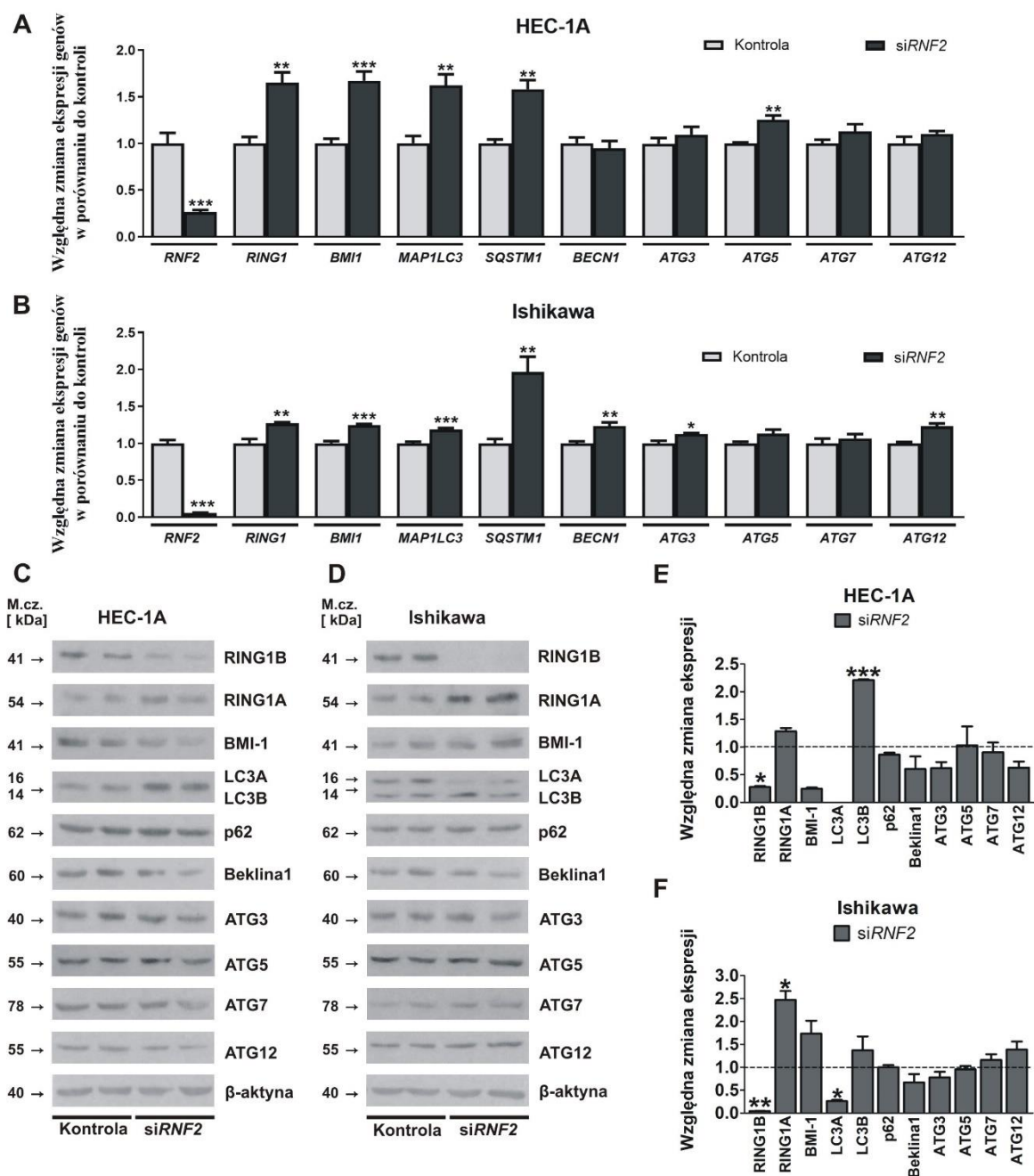
Oceniono wpływ RING1A/B na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii w komórkach raka endometrium HEC-1A oraz Ishikawa. W tym celu ekspresję genów *RING1* i *RNF2* zmniejszono metodą interferencji RNA. Wpływ interferencji *RING1/RNF2* na ekspresję innych genów kompleksu PRC1 (*RING1*, *RNF2*, *BMI1*) oraz ekspresję genów związanych z autofagią (*MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12*) określono za pomocą metod Real Time PCR oraz Western blotting w komórkach hodowanych w standardowych warunkach tj. w medium zawierającym glukozę w stężeniu 25 mM.

W wyniku interferencji *RING1* dochodzi do około 80% spadku poziomu białka RING1A w obu liniach komórkowych raka endometrium (**Ryc. 5C, 5D**). Po 48 godzinach od zastosowania siRNA zaobserwowano również niewielki (15%) spadek ekspresji *RNF2* na poziomie transkryptu w linii Ishikawa, ale nie zaobserwowano zmian w ekspresji *RNF2/RING1B* w komórkach HEC-1A. W obu liniach komórkowych w wyniku wyciszenia ekspresji *RING1* zaobserwowano spadek ekspresji *BMI1* na poziomie białka, jednak żadne zmiany nie zostały stwierdzone na poziomie mRNA. W przypadku genów związanych z autofagią, w obu liniach doszło do spadku ekspresji *MAP1LC3* na poziomie transkryptu. Istotny wzrost ekspresji formy LC3B na poziomie białka obserwuje się jedynie w linii Ishikawa. Po wyciszeniu ekspresji *RING1* wykazano wzrost ekspresji *SQSTM1* na poziomie mRNA w komórkach HEC-1A i Ishikawa, ale nie obserwuje się zmian ekspresji p62 na poziomie białka w obu liniach komórkowych. Ekspresja pozostałych genów tj. *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* na poziomie transkryptu i białka w linii HEC-1A nie ulega istotnym zmianom. Obserwuje się spadek ekspresji *BECN1* i *ATG7* na poziomie mRNA i białka oraz *ATG3* i *ATG12* jedynie na poziomie transkryptu w komórkach Ishikawa.



Rycina 5. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po wyciszeniu ekspresji *RING1* w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek rosnących w standardowych warunkach 30 nM siRING1 oraz siRNA nie wykazującym homologii do genów człowieka (kontrola). Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62, beklina 1, ATG3, ATG5, ATG7 i ATG12 48 godzin po zastosowaniu 30 nM siRING1 (**C**, **D**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po wyciszeniu ekspresji *RING1* przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

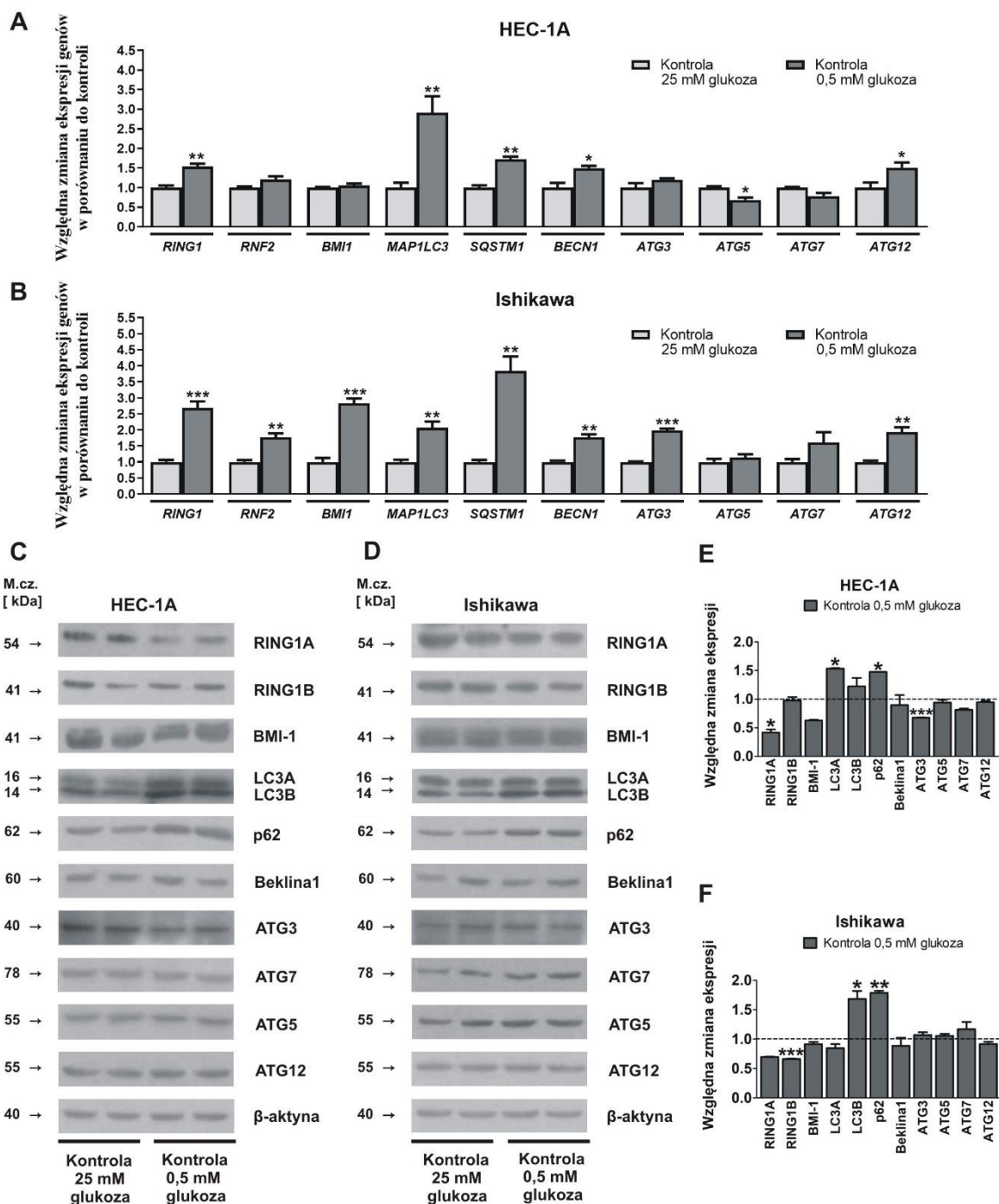
W skład rdzenia kompleksu PRC1 może wchodzić także białko RING1B, kodowane przez gen *RNF2*. W wyniku wyciszenia *RNF2* obserwuje się 75% spadek ekspresji tego genu na poziomie mRNA (**Ryc. 6A**) i białka (**Ryc. 6C**) w komórkach HEC-1A oraz 95% spadek ekspresji genu na poziomie mRNA i białka w komórkach Ishikawa (odpowiednio, **Ryc. 6B, 6D**). Ponadto zaobserwowano wzrost ekspresji *RING1* na poziomie transkryptu i białka w obu liniach. Odnotowano także wzrost ekspresji *BMI1* na poziomie mRNA, jednak nie obserwuje się istotnych zmian na poziomie białka. Po wyciszeniu ekspresji *RNF2* wykazano wzrost poziomu *MAP1LC3* i LC3B w linii komórkowej HEC-1A, w linii komórkowej Ishikawa znaczny wzrost ekspresji genu obserwuje się jedynie na poziomie transkryptu. Obserwuje się także wzrost ekspresji *SQSTM1* na poziomie mRNA, chociaż nie ma zmian w ekspresji p62 na poziomie białka. W przypadku pozostałych genów związanych z procesem autofagii, obserwuje się niewielki wzrost ekspresji niektórych genów na poziomie transkryptu tj. *ATG5* w komórkach HEC-1A oraz *BECN1*, *ATG3* i *ATG12* w komórkach Ishikawa.



Rycina 6. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po wyciszeniu ekspresji *RNF2* w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek rosnących w standardowych warunkach 30 nM siRNF2 oraz siRNA nie wykazującym homologii do genów człowieka (kontrola). Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62, beklina 1, ATG3, ATG5, ATG7 i ATG12 48 godzin po zastosowaniu 30 nM siRNF2 (**C**, **D**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po wyciszeniu ekspresji *RNF2* przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Porównano ekspresję genów w komórkach hodowanych w warunkach hipoglikemii (0,5 mM glukoza) z ekspresją genów w komórkach hodowanych w warunkach standardowych (25 mM glukoza). Uzyskane wyniki przedstawiono na **Ryc. 7**.

W obu liniach komórkowych obserwuje się wzrost ekspresji *RING1* na poziomie mRNA w komórkach hodowanych w warunkach obniżonego poziomu glukozy (**Ryc. 7A, 7B**), dochodzi natomiast do spadku ilości białka RING1A (**Ryc. 7C, 7D**). Zmiana stężenia glukozy wywołuje również istotny wzrost ekspresji *RNF2* na poziomie transkryptu, przy jednoczesnym spadku ilości białka RING1B ale tylko w komórkach Ishikawa. W przypadku *BMI1* zaobserwowano jedynie wzrost jego ekspresji na poziomie transkryptu w linii Ishikawa. Wyniki analizy wykazały istotny wzrost ekspresji mRNA *MAP1LC3* i *SQSTM1* oraz białek LC3A/B i p62 w obu liniach komórkowych. W przypadku ekspresji na poziomie transkryptu dochodzi do wzrostu ekspresji *BECN1* i *ATG12* oraz spadku ekspresji *ATG5* w komórkach HEC-1A, obserwuje się także wzrost ekspresji *BECN1*, *ATG3* i *ATG12* w komórkach Ishikawa.



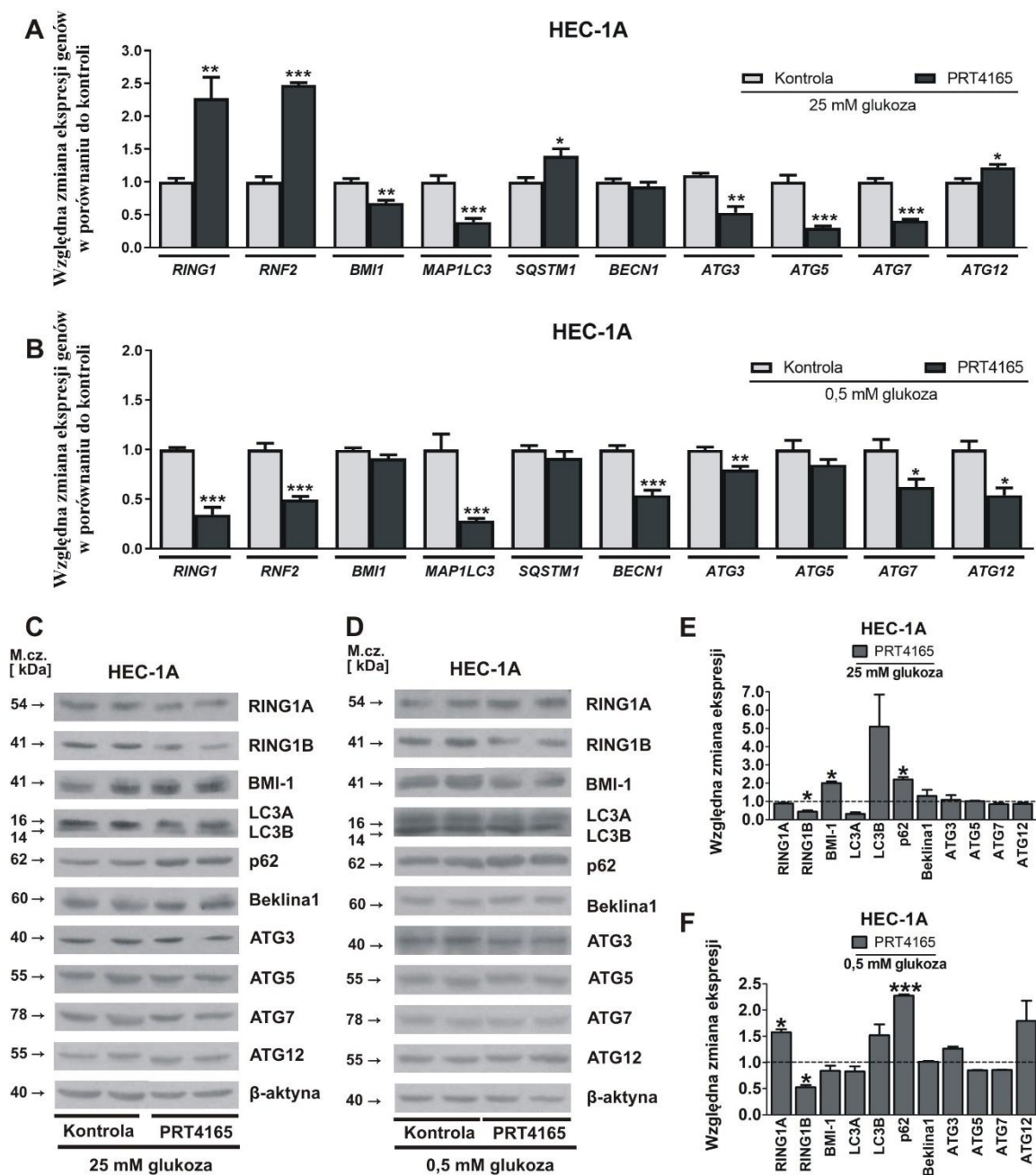
Rycina 7. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii w warunkach standardowych (25mM) i warunkach hipoglikemii (0,5 mM) w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* w warunkach hipoglikemii w stosunku do kontroli w warunkach standardowych po 48 godzinach. Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji *RING1A*, *RING1B*, *BMI-1*, *LC3A/B*, *p62*, *bekliny 1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* po 48 godzinach (**C**, **D**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

PRT4165 (ang. 2-(3-pyridinylmethylene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) to niskocząsteczkowy inhibitor, który blokuje aktywność białek zarówno RING1A, jak i RING1B.

Określono wpływ PRT4165 na ekspresję genów biorących udział w procesie autofagii w komórkach linii HEC-1A i Ishikawa rosnących w warunkach standardowych i obniżonej zawartości glukozy. PRT4165 zastosowano w stężeniu odpowiadającym IC₅₀ wyznaczonym po uprzednim zastosowaniu testu MTT.

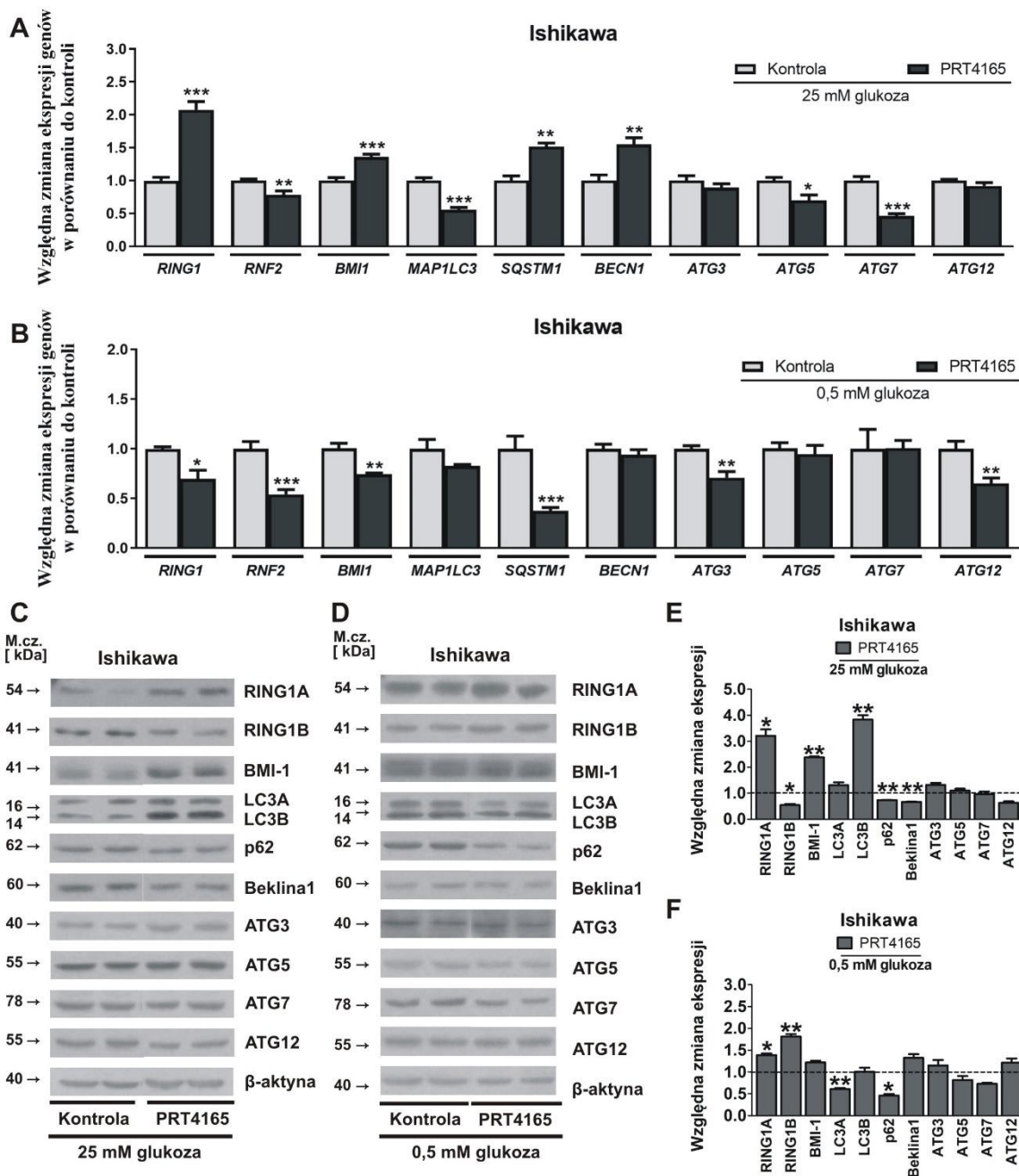
Uzyskane wyniki wskazują, że w komórkach HEC-1A zastosowanie PRT4165 w warunkach standardowych istotnie wpływa na wzrost ekspresji zarówno *RING1* jak i *RNF2* na poziomie transkryptu (**Ryc. 8A**) przy jednoczesnym spadku na poziomie białka. W przypadku BMI-1 tendencja jest odwrotna tj. obserwuje się wzrost ilości białka BMI-1 przy jednoczesnym spadku ekspresji *BMI1* na poziomie mRNA (**Ryc. 8A, 8C**). Wykazano również spadek ekspresji *MAP1LC3*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* na poziomie transkryptu, przy braku istotnych zmian na poziomie białka (**Ryc. 8A, 8C**). Ponadto dochodzi do wzrostu ekspresji *SQSTM1*/p62 na poziomie mRNA i białka.

W warunkach hipoglikemii w przeciwieństwie do komórek hodowanych w 25 mM glukozie zaobserwowano istotny spadek ekspresji *RING1* i *RNF2* na poziomie transkryptu (**Ryc. 8B**). Ekspresja RING1B na poziomie białka jest istotnie obniżona, jednak obserwuje się wzrost ekspresji RING1A (**Ryc. 8D**). Nie obserwuje się zmian w ekspresji *BMI1*. Podobnie jak w warunkach standardowych, w warunkach obniżonego poziomu glukozy wykazano spadek ekspresji *MAP1LC3* na poziomie transkryptu oraz brak istotnych zmian na poziomie białka. Po zastosowaniu PRT4165 zaobserwowano wzrost poziomu białka p62.



Rycina 8. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po zahamowaniu aktywności *RING1/RNF2* z użyciem inhibitora PRT4165 w komórkach HEC-1A w warunkach standardowych i obniżonym stężeniu glukozy. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek rosnących w standardowych warunkach PRT4165. Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62, bekliny 1, ATG3, ATG5, ATG7 i ATG12 48 godzin po traktowaniu PRT4165 (**C**, **D**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po traktowaniu PRT4165 przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

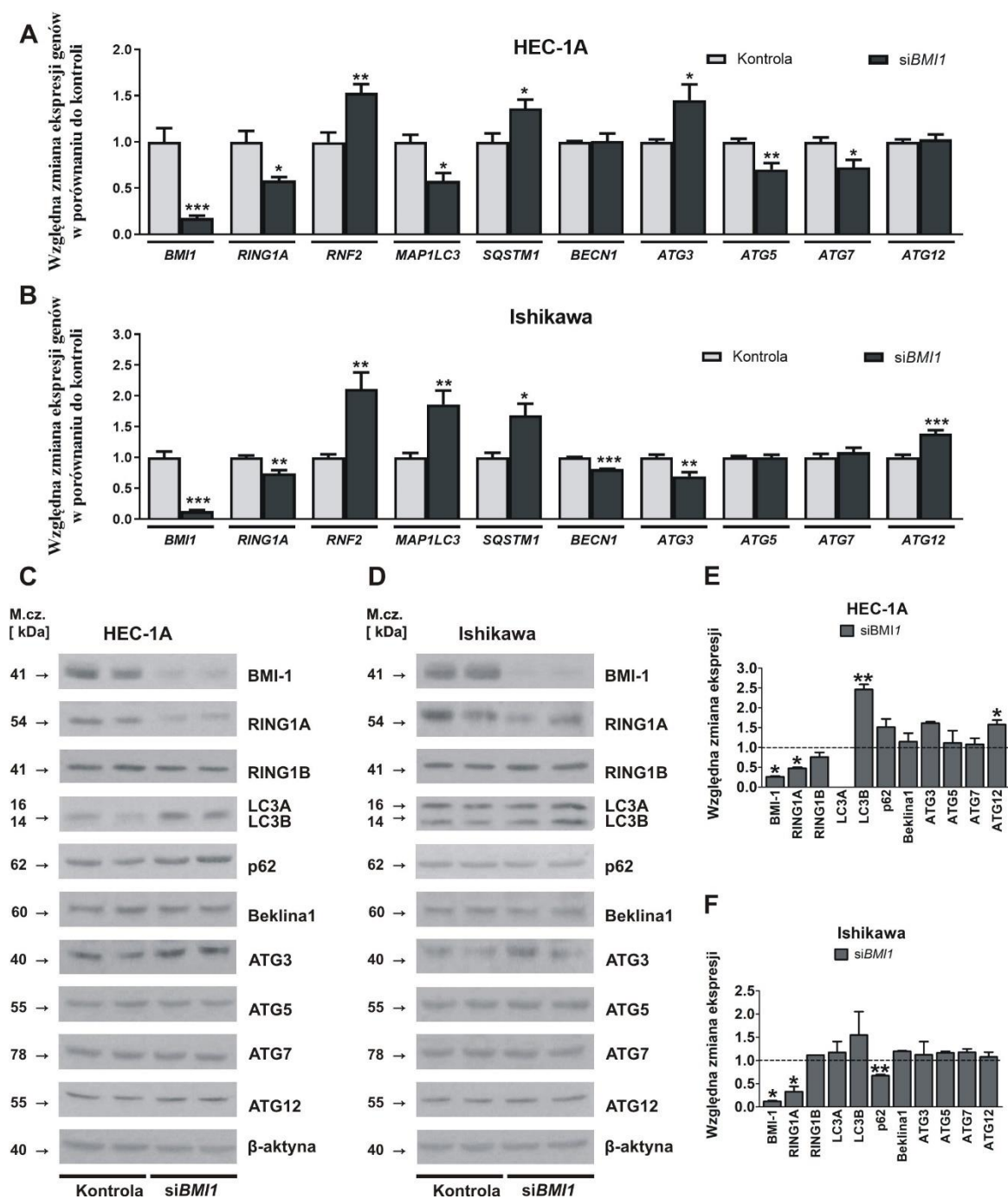
W komórkach Ishikawa po traktowaniu PRT4165 w warunkach standardowych wykazano spadek ekspresji *RNF2* na poziomie mRNA i białka (**Ryc. 9A, 9C**). Ponadto zaobserwowano wzrost ekspresji *RING1* i *BMI1* na poziomie transkryptu i białka, co może świadczyć o bezpośredniej zależności między tymi trzema białkami. Wykazano spadek ekspresji *MAP1LC3* na poziomie transkryptu przy istotnym wzroście poziomu formy LC3B oraz wzrost ekspresji *SQSTM1* i *BECN1* na poziomie mRNA przy jednoczesnym spadku ekspresji p62 i bekliny 1 (**Ryc. 9A, 9C**). W przypadku pozostałych genów nie stwierdzono zmian w ekspresji na poziomie białka, obserwuje się niewielkie zmiany w ekspresji na poziomie mRNA tj. spadek ekspresji *ATG5* i *ATG7*. W warunkach hipoglikemii zaobserwowano spadek ekspresji *RING1*, *RNF2* i *BMI1* na poziomie mRNA przy jednoczesnym wzroście ekspresji *RING1A* i *RING1B* na poziomie białka. Nie zaobserwowano zmian w ekspresji BMI-1. Po traktowaniu komórek Ishikawa PRT4165 doszło do istotnego spadku poziomu białka LC3A/B. Wykazano także istotny spadek ekspresji *SQSTM1* i p62 na poziomie transkryptu i białka (**Ryc. 9B, 9D**). Pozostałe geny nie wykazują zmian w ekspresji na poziomie białka, obserwuje się niewielkie zmiany w ekspresji na poziomie mRNA tj. spadek ekspresji *ATG3* i *ATG12* (**Ryc. 9B**).



Rycina 9. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po zahamowaniu aktywności *RING1/RNF2* z użyciem inhibitora PRT4165 w komórkach Ishikawa w warunkach standardowych i obniżonym stężeniu glukozy. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek rosnących w standardowych warunkach PRT4165. Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62, bekliny 1, ATG3, ATG5, ATG7 i ATG12 48 godzin po traktowaniu PRT4165 (**C**, **D**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po traktowaniu PRT4165 przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

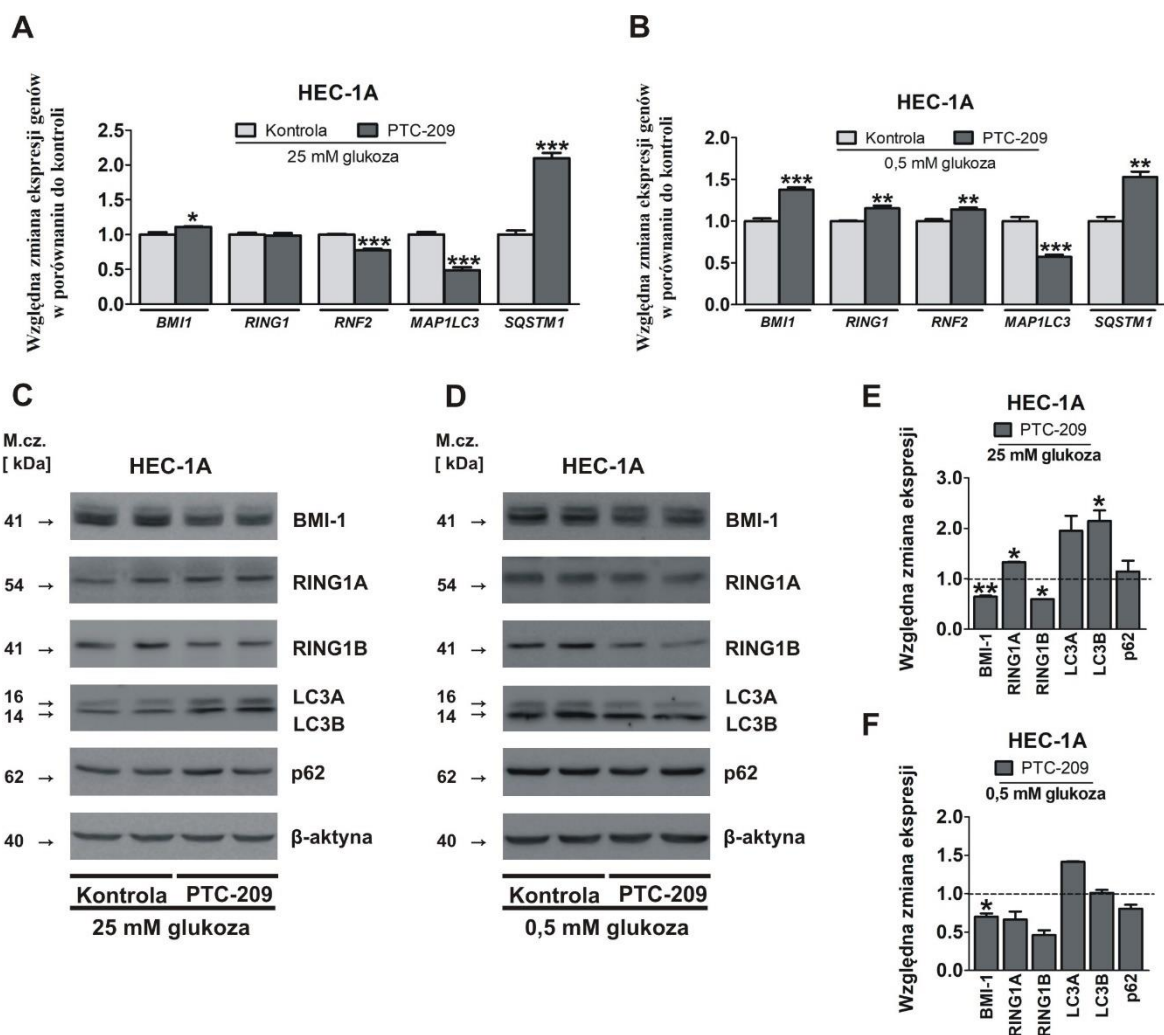
7.2. Wpływ wyciszenia/zahamowania aktywności BMI-1 i stężenia glukozy na ekspresję genów zaangażowanych w proces autofagii

Oceniono wpływ wyciszenia *BMI1* metodą interferencji RNA na ekspresję genów kodujących *RING1A/B* oraz biorących udział w procesie autofagii w komórkach raka endometrium. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały 83% spadek ekspresji *BMI1* na poziomie transkryptu i 75% spadek na poziomie białka w komórkach HEC-1A oraz około 90% spadek ekspresji *BMI1* na poziomie mRNA i białka w komórkach Ishikawa. Zaobserwowano także spadek ekspresji *RING1* na poziomie mRNA i białka w obu liniach. Po wyciszeniu *BMI1* dochodzi do wzrostu ekspresji *RNF2* na poziomie transkryptu, bez istotnych zmian na poziomie białka (**Ryc. 10A, 10B**). W przypadku białek zaangażowanych w proces autofagii, obserwuje się spadek ekspresji *MAP1LC3* przy jednoczesnym wzroście poziomu formy LC3B w komórkach HEC-1A. Ekspresja *MAP1LC3* spada w komórkach Ishikawa, nie obserwuje się także istotnych zmian na poziomie białka. W obu liniach komórkowych wykazano wzrost ekspresji *SQSTM1*, istotny spadek poziomu białka p62 obserwuje się tylko w linii Ishikawa (**Ryc. 10D**). Dochodzi także do zmian w ekspresji *ATG3*, *ATG5* i *ATG7* na poziomie mRNA oraz *ATG12* na poziomie białka w komórkach HEC-1A. W komórkach Ishikawa obserwuje się spadek ekspresji *BECN1*, *ATG3* i wzrost *ATG12* na poziomie transkryptu (**Ryc. 10B**).



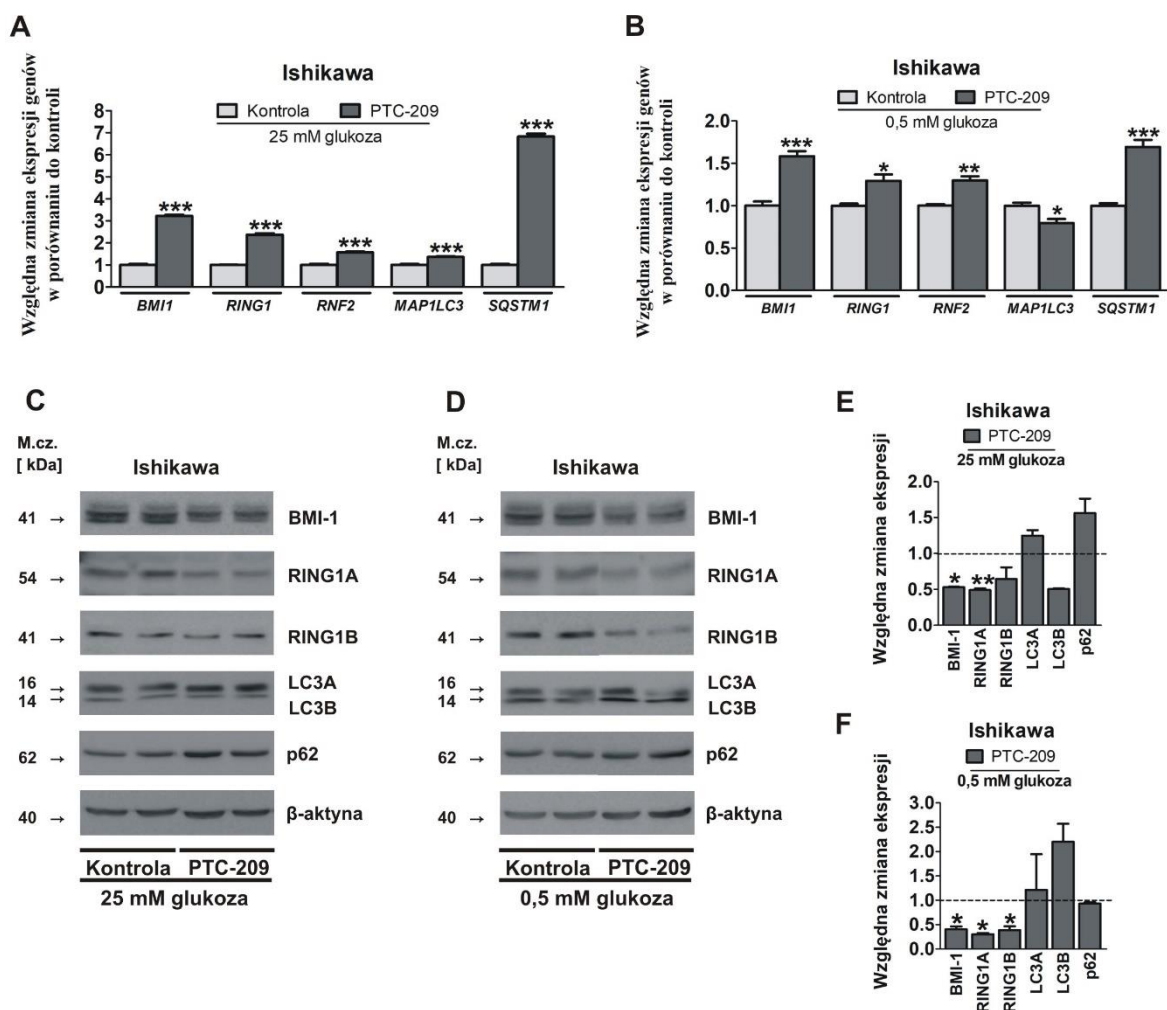
Rycina 10. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po wyciszeniu ekspresji BMI1 w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1*, *BECN1*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* i *ATG12* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek rosnących w standardowych warunkach 45 nM siBMI1 oraz siRNA nie wykazującym homologii do genów człowieka (kontrola). Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62, beklina 1, ATG3, ATG5, ATG7 i ATG12 48 godzin po zastosowaniu 45 nM siBMI1. Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń (**C**, **D**). Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po wyciszeniu ekspresji BMI1 przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

PTC-209 jest niskocząsteczkowym inhibitorem białka BMI-1. Dane literaturowe wskazują, że związek ten może mieć potencjalne zastosowanie w terapii nowotworów. W związku z tym dokonano analizy ekspresji białek kompleksu PRC1 oraz dwóch kluczowych markerów autofagii – LC3A/B oraz p62 w warunkach standardowych oraz w warunkach hipoglikemii. W komórkach HEC-1A stwierdzono zarówno w warunkach standardowych jak i hipoglikemii, istotny spadek poziomu białka BMI-1 (**Ryc. 11C, 11D**) przy jednoczesnym wzroście ekspresji *BMI1* na poziomie mRNA (**Ryc. 11A, 11B**), co może świadczyć o efekcie kompensacji. Podobnie w warunkach hipoglikemii obserwuje się także wzrost ekspresji *RING1* i *RNF2* na poziomie mRNA przy jednoczesnym spadku na poziomie białka. Pomimo wzrostu ekspresji *SQSTM1* nie obserwuje się zmian w ilości p62. Wzrost ekspresji LC3B obserwuje się tylko w komórkach hodowanych w warunkach standardowych.



Rycina 11. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po zahamowaniu ekspresji *BMI1* z użyciem inhibitora PTC-209 w komórkach HEC-1A w warunkach standardowych i obniżonym stężeniu glukozy. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek PTC-209. Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62 48 godzin po traktowaniu PTC-209. Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń (**C**, **D**). Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po traktowaniu PTC-209 przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**E**, **F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Uzyskane wyniki dla komórek Ishikawa traktowanych PTC-209, podobnie jak w przypadku komórek HEC-1A wykazały istotny spadek ekspresji BMI-1 na poziomie białka (**Ryc. 12C**, **12D**) przy jednoczesnym wzroście ekspresji *BMI1* na poziomie transkryptu (**Ryc. 12A**, **12B**), co może świadczyć o efekcie kompensacji. Zaobserwowano również wzrost ekspresji *RING1* i *RNF2* na poziomie mRNA oraz spadek ekspresji na poziomie białka. W przypadku komórek hodowanych w standardowych warunkach obserwuje się także wzrost ekspresji *MAP1LC3* i *SQSTM1* na poziomie mRNA oraz białka.

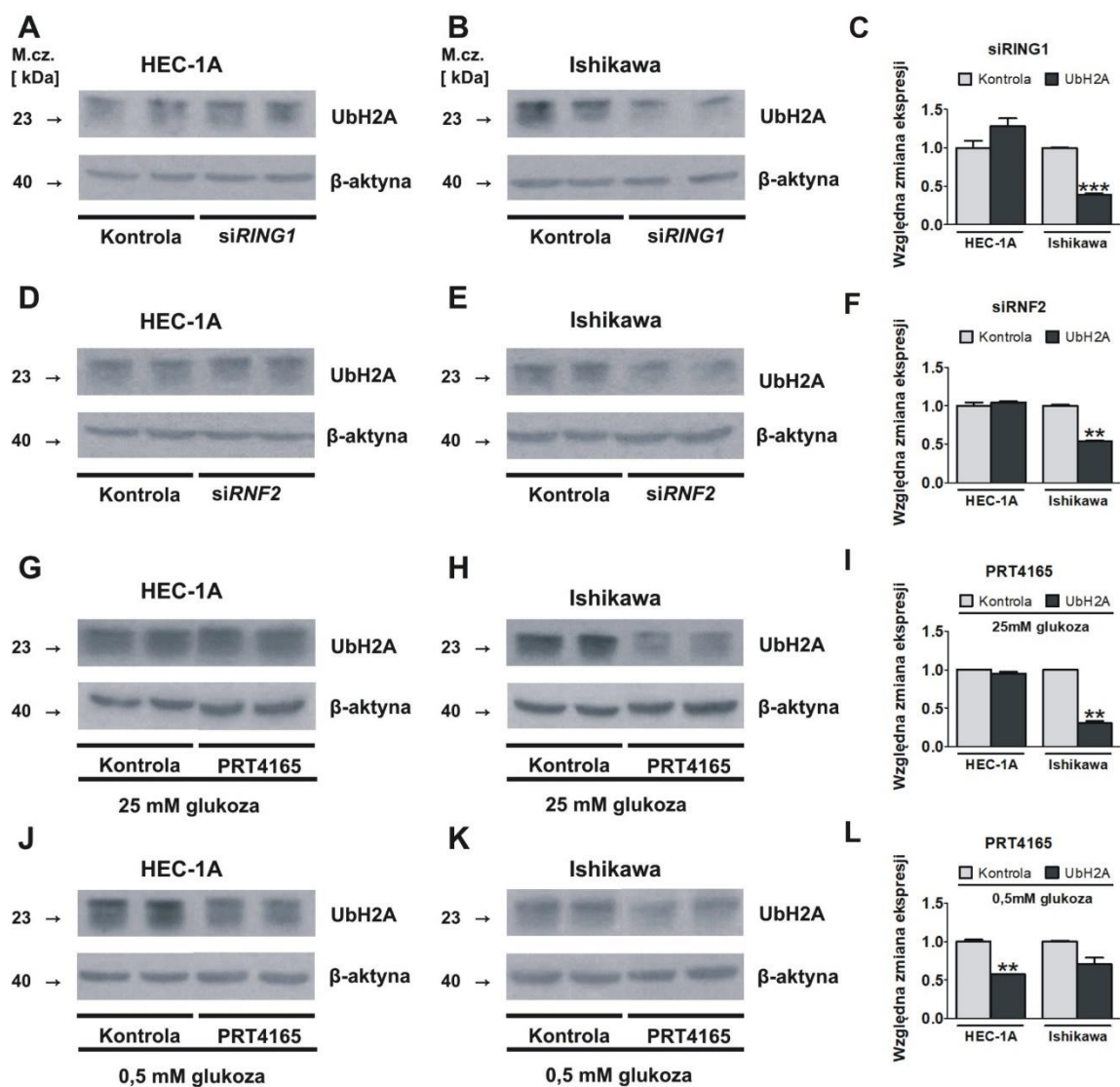


Rycina 12. Ekspresja genów kodujących białka kompleksu PRC1 oraz genów zaangażowanych w proces autofagii po zahamowaniu ekspresji *BMI1* z użyciem inhibitora PTC-209 w komórkach Ishikawa w warunkach standardowych i obniżonym stężeniu glukozy. Względna ekspresja genów *RING1*, *RNF2*, *BMI1*, *MAP1LC3*, *SQSTM1* w stosunku do kontroli 48 godzin po traktowaniu komórek PTC-209. Wyniki stanowią średnią z 3 powtórzeń (**A**, **B**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji RING1A, RING1B, BMI-1, LC3A/B, p62 48 godzin po traktowaniu PTC-209 (**C**, **D**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek po traktowaniu PTC-209 przedstawione jako względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**12E**, **12F**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

7.3. Określenie poziomu ubikwitynylacji histonu H2A w komórkach z zahamowaną ekspresją/aktywnością RING1A/B i BMI-1

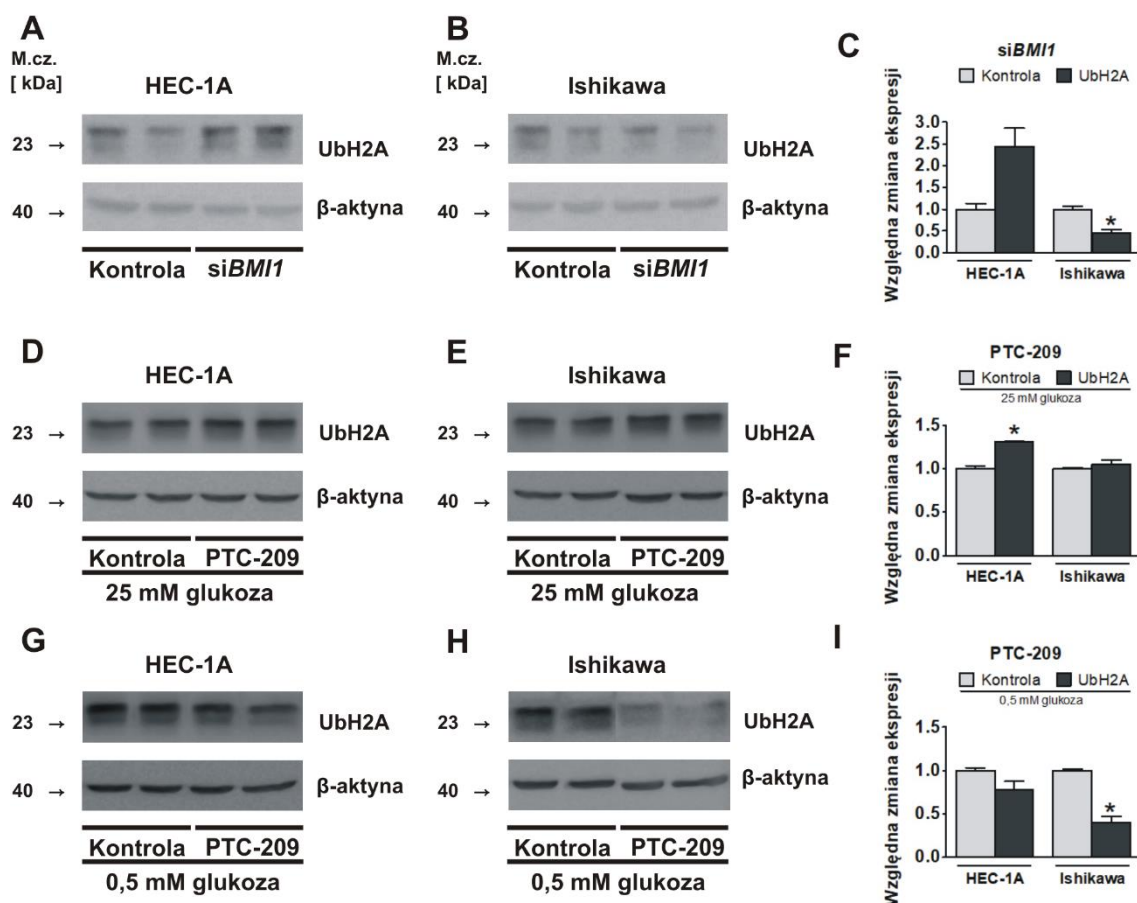
Ponieważ kompleks PRC1, którego składnikami są RING1A/B i BMI-1 jest zaangażowany w ubikwitynylację histonu H2A oceniono wpływ wyciszenia genów lub zahamowania aktywności białek na tę modyfikację. Chociaż zarówno RING1A, jak i RING1B są zaangażowane w monoubikwitynylację histonu H2A, wydaje się, że dominującą rolę pełni RING1B, którego utrata prowadzi zwykle do znacznego spadku ubikwitynylacji H2A. Utrata RING1A ma na to tylko niewielki wpływ [8].

W związku z tym, oceniono poziom ubikwitynylacji histonu H2A w liniach komórkowych HEC-1A i Ishikawa po interferencji RNA, a także traktowaniu PRT4165 w warunkach standardowych oraz hipoglikemii. Analiza wykonana metodą Western blotting wykazała w komórkach linii HEC-1A istotny spadek ubikwitynylacji histonu H2A tylko po traktowaniu PRT4165 w warunkach hipoglikemii (**Ryc. 13J/L**). W przypadku komórek linii Ishikawa doszło do spadku poziomu ubikwitynylacji zarówno w wyniku interferencji RNA jak i traktowania PRT4165 w warunkach standardowych.



Rycina 13. Wyciszenie/zahamowanie ekspresji *RING1* i *RNF2* wpływa na ubikwitynylację histonu H2A na lizynie 119. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji UbH2A w komórkach HEC-1A i Ishikawa 48 godzin po interferencji RNA (**A, B, D, E**) oraz traktowaniu PRT4165 w różnym stężeniu glukozy – 25 mM (**G, H**) i 0,5 mM (**J, K**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ilości UbH2A po wyciszeniu/zahamowaniu ekspresji *RING1*/*RNF2* (**C, F, I, L**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Oceniono poziom ubikwitynylacji histonu H2A w liniach komórkowych HEC-1A i Ishikawa po interferencji RNA, a także traktowaniu PTC-209 w warunkach standardowych oraz hipoglikemii. Analiza wykonana metodą Western blotting wykazała wzrost poziomu ubikwitynylacji histonu H2A po traktowaniu PTC-209 w warunkach standardowych oraz spadek w warunkach hipoglikemii. W przypadku komórek HEC-1A obserwowano również wzrost poziomu ubikwitynylowanego histonu H2A po interferencji RNA.



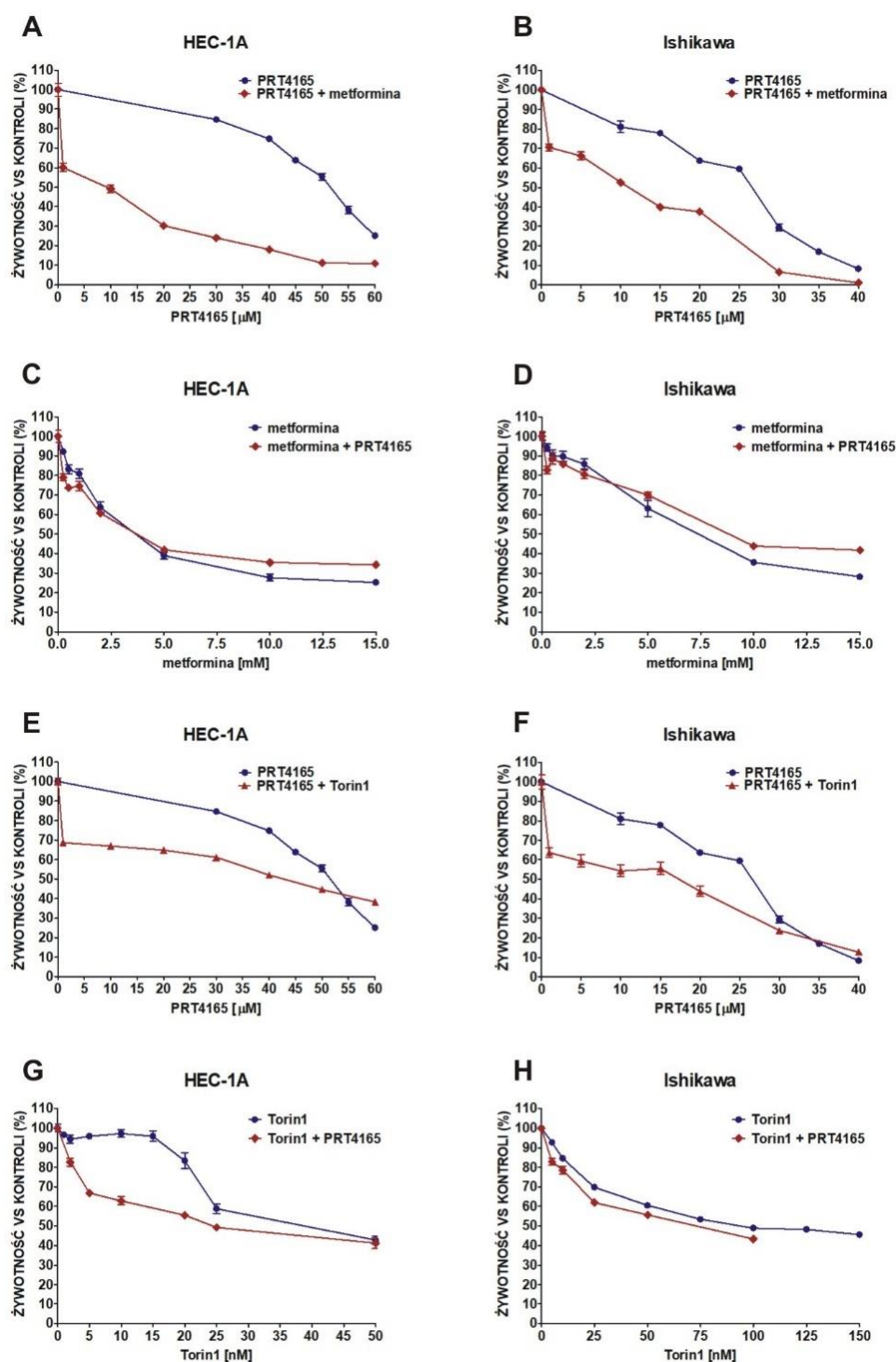
Rycina 14. Wyciszenie/zahamowanie ekspresji BMI1 wpływa na ubikwitynylację histonu H2A na lizynie 119. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji UbH2A w komórkach HEC-1A i Ishikawa 48 godzin po interferencji RNA (**A, B**) oraz traktowaniu PTC-209 w różnym stężeniu glukozy – 25 mM (**D, E**) i 0,5 mM (**G, H**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ilości UbH2A po wyciszeniu/zahamowaniu ekspresji BMI1 (**C, F, I**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

7.4. Określenie wpływu zahamowania aktywności RING1A/B i BMI-1 pojedynczo lub w kombinacji z induktorami autofagii na żywotność komórek

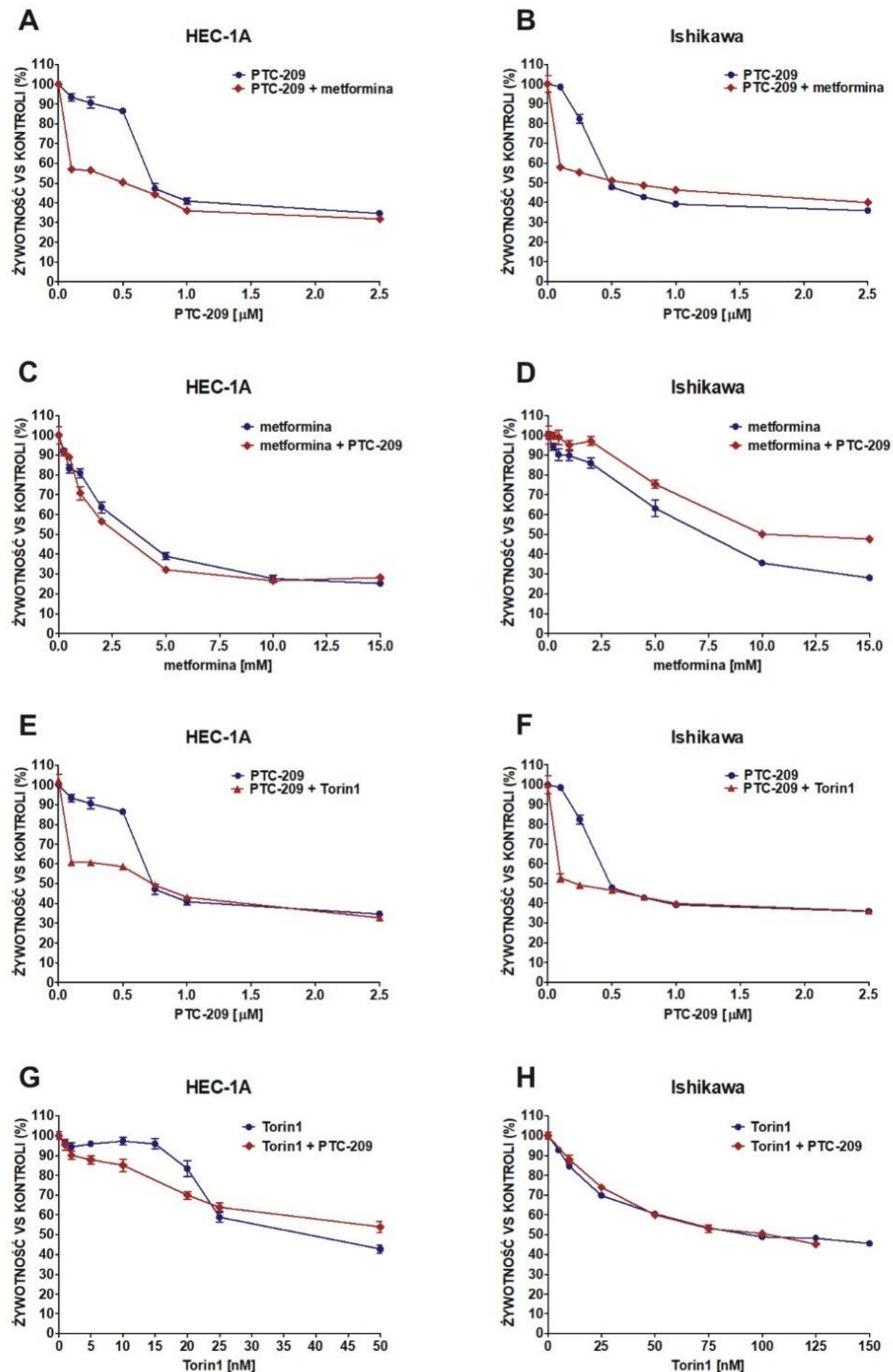
Wykorzystując test MTT zbadano wpływ inhibitorów PRT4165 i PTC-209 pojedynczo oraz w kombinacji z induktorami autofagii – metforminą i Torin1 na żywotność komórek HEC-1A i Ishikawa (**Rycina 15-16**). W pierwszym etapie ustalono stężenie IC_{50} dla pojedynczych związków. Następnie komórki traktowano odpowiednio jednym związkiem w stężeniu IC_{50} oraz drugim związkiem w określonym szeregu stężeń w celu wyznaczenia jego stężenia IC_{50} w kombinacji. Wyznaczone wartości IC_{50} wszystkich związków przedstawiono w Tabeli 5.

Korzystając z metody Chou-Talalaya wyliczono wskaźnik CI (ang. *Combination Index*), którego wartość określa jak oddziałują na siebie związki w zastosowanych kombinacjach. Aby określić oddziaływanie między związkami w zastosowanych kombinacjach wykonano obliczenia wskaźnika CI wykorzystując otrzymane wartości IC_{50} .

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie PRT4165 w kombinacji z metforminą daje niewielki efekt antagonistyczny w komórkach HEC-1A i efekt antagonistyczny w komórkach Ishikawa. Kombinacja PRT4165 z Torin1 daje efekt antagonistyczny w obu liniach komórkowych. Analogiczne eksperymenty z wykorzystaniem PTC-209 w kombinacji z metforminą i Torin1 wykazały, że zastosowane kombinacje związków wykazują efekt antagonistyczny w obu liniach komórkowych (**Tabela 6**).



Rycina 15. Wyniki analizy wpływu PRT4165 pojedynczo i w kombinacji z induktorami autofagii metforminą i Torin1 na żywotność komórek. Żywotność komórek w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem RING1A/B pojedynczo i w kombinacji z metforminą dla linii komórkowej HEC-1A (**A, C**) oraz linii Ishikawa (**B, D**), a także po traktowaniu inhibitorem RING1A/B pojedynczo i w kombinacji z Torin1 dla linii komórkowej HEC-1A (**E, G**) oraz linii Ishikawa (**F, H**). Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.



Rycina 16. Wyniki analizy wpływu PTC-209 pojedynczo i w kombinacji z induktorami autofagii metforminą i Torin1 na żywotność komórek. Żywotność komórek w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem BMI-1 pojedynczo i w kombinacji z metforminą dla linii komórkowej HEC-1A (A, C) oraz linii Ishikawa (B, D), a także po traktowaniu inhibitorem BMI-1 pojedynczo i w kombinacji z Torin1 dla linii komórkowej HEC-1A (E, G) oraz linii Ishikawa (F, H). Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

Tabela 5. Wartości IC₅₀ używanych związków

Pojedynczy związek / związek użyty w kombinacji	IC ₅₀	
	HEC-1A	Ishikawa
PRT4165	51,6 µM	26,9 µM
PTC-209	0,6 µM	0,4 µM
metformina	3,5 mM	7,2 mM
Torin1	36 nM	84 nM
PRT4165 + metformina	9,8 µM	10,6 µM
metformina + PRT4165	3,4 mM	8,8 mM
PRT4165 + Torin1	42 µM	17 µM
Torin1 + PRT4165	23,8 nM	72 nM
PTC-209 + metformina	0,5 µM	0,6 µM
metformina + PTC-209	2,6 mM	10 mM
PTC-209 + Torin1	0,72 µM	0,2 µM
Torin1 + PTC-209	58 nM	100 nM

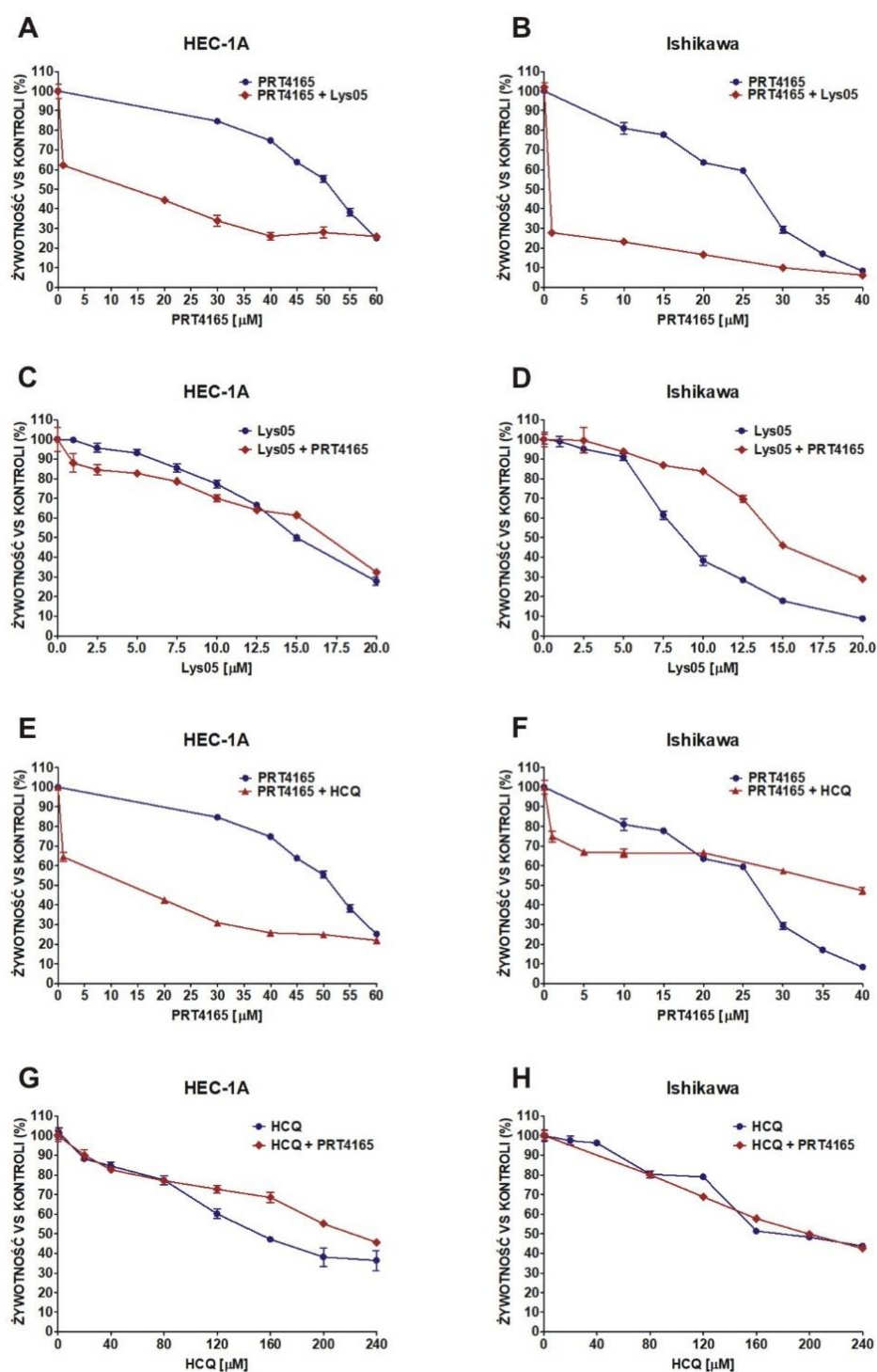
Tabela 6. Ocena oddziaływań między PRT4165 lub PTC-209 w kombinacji z induktorami autofagii metforminą i Torin1 na podstawie wyliczonego współczynnika CI dla komórek HEC-1A i Ishikawa.

	HEC-1A		Ishikawa	
	CI	oddziaływania	CI	oddziaływania
PRT4165 + metformina	1,16	niewielki antagonizm	1,61	antagonizm
PRT4165 + Torin1	1,47	antagonizm	1,48	antagonizm
PTC-209 + metformina	1,57	antagonizm	2,89	antagonizm
PTC-209 + Torin1	2,81	antagonizm	1,69	antagonizm

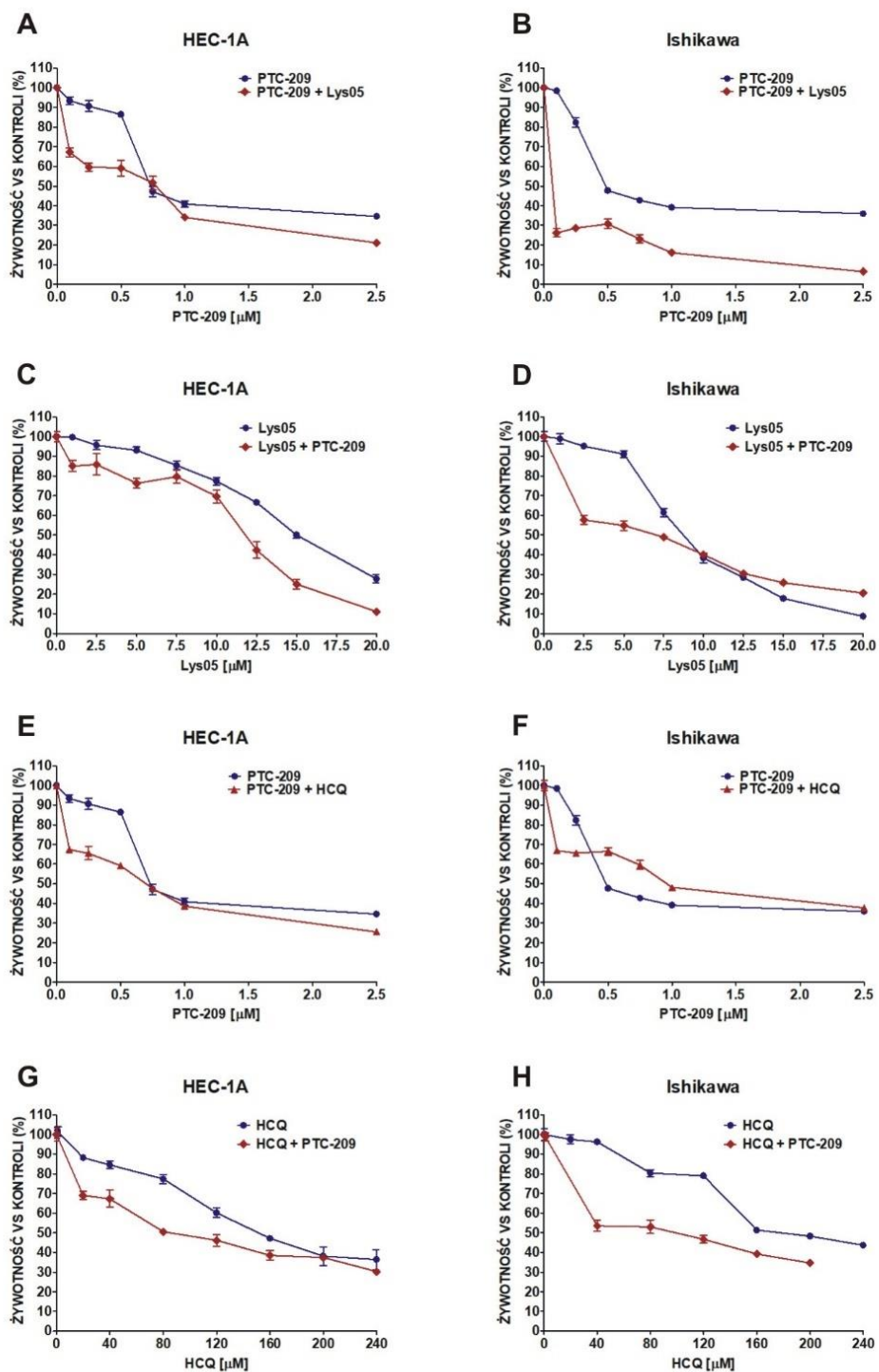
7.5. Określenie wpływu zahamowania aktywności RING1A/B i BMI-1 pojedynczo lub w kombinacji z inhibitorami autofagii na żywotność komórek

Oceniono żywotność komórek po traktowaniu komórek linii HEC-1A i Ishikawa z użyciem inhibitorów PRT4165 i PTC-209 pojedynczo oraz w kombinacji z inhibitorami autofagii Lys05 i hydroksychlorochiną (HCQ) (**Rycina 17-18**). Przeprowadzono analogiczne eksperymenty jak w przypadku induktorów autofagii. Wyznaczone wartości IC_{50} wszystkich związków przedstawiono w Tabeli 7.

Następnie wyliczono współczynnik CI dla każdej kombinacji związków (**Tabela 8**). Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie PRT4165 w połączeniu z Lys05 i HCQ wykazuje efekt antagonistyczny w obu liniach komórkowych. Analogiczne eksperymenty z zastosowaniem PTC-209 w kombinacji z Lys05 wykazują efekt antagonistyczny w linii komórkowej HEC-1A, ale niewielki efekt synergistyczny w linii komórkowej Ishikawa. Kombinacja PTC-209 z HCQ daje efekt antagonistyczny w obu liniach komórkowych.



Rycina 17. Wyniki analizy wpływu PRT4165 pojedynczo i w kombinacji z inhibitorami autofagii Lys05 i HCQ na żywotność komórek. Żywotność komórek w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem RING1A/B pojedynczo i w kombinacji z Lys05 dla linii komórkowej HEC-1A (**A, C**) oraz linii Ishikawa (**B, D**), a także po traktowaniu inhibitorem RING1A/B pojedynczo i w kombinacji z HCQ dla linii komórkowej HEC-1A (**E, G**) oraz linii Ishikawa (**F, H**). Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.



Rycina 18. Wyniki analizy wpływu PTC-209 pojedynczo i w kombinacji z inhibitorami autofagii Lys05 i HCQ na żywotność komórek. Żywotność komórek w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem BMI-1 pojedynczo i w kombinacji z Lys05 dla linii komórkowej HEC-1A (**A**, **C**) oraz linii Ishikawa (**B**, **D**), a także po traktowaniu inhibitorem BMI-1 pojedynczo i w kombinacji z HCQ dla linii komórkowej HEC-1A (**E**, **G**) oraz linii Ishikawa (**F**, **H**). Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

Tabela 7. Wartości IC₅₀ używanych związków

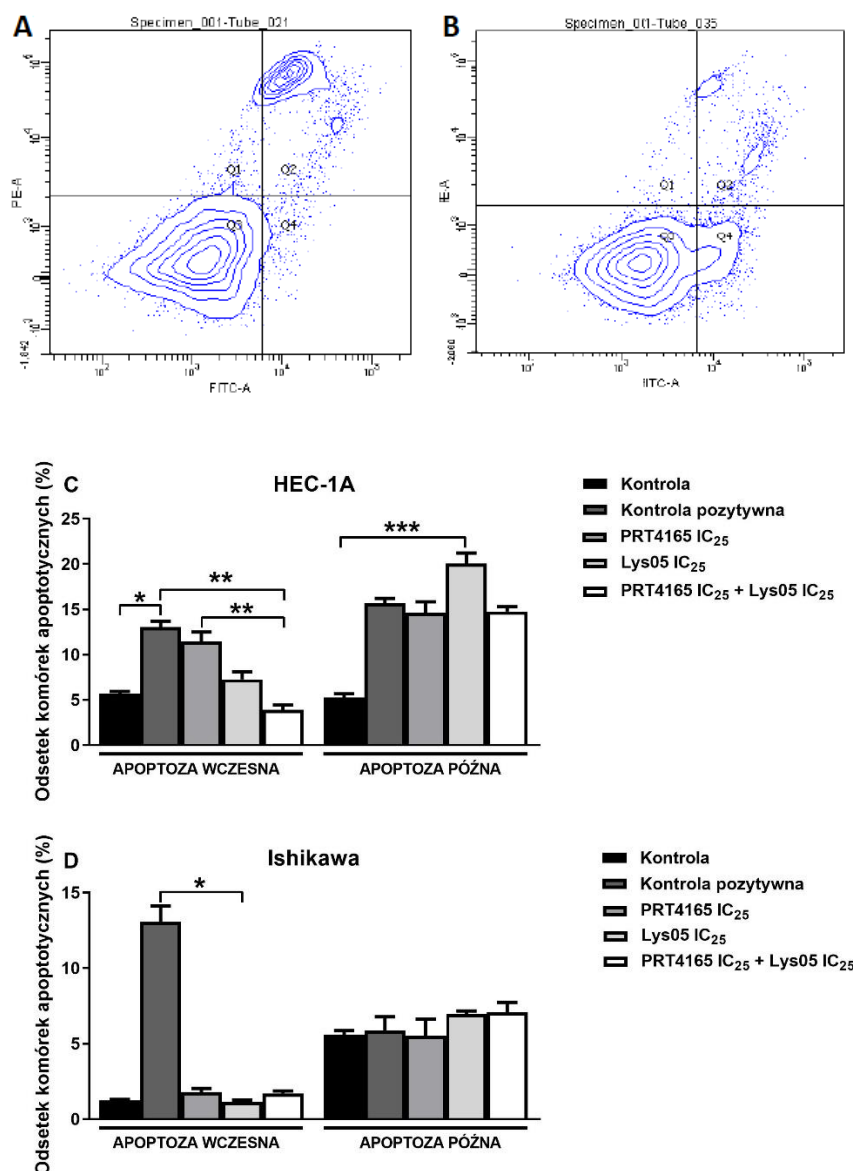
Pojedynczy związek / związek użyty w kombinacji	IC ₅₀	
	HEC-1A	Ishikawa
PRT4165	51,6 µM	26,9 µM
PTC-209	0,6 µM	0,4 µM
Lys05	15 µM	8,6 µM
HCQ	150 µM	170 µM
PRT4165 + Lys05	14 µM	0,6 µM
Lys05 + PRT4165	17,1 µM	14,7 µM
PRT4165 + HCQ	13,3 µM	38,5 µM
HCQ + PRT4165	220 µM	198 µM
PTC-209 + Lys05	0,8 µM	0,06 µM
Lys05 + PTC-209	11,8 µM	6,3 µM
PTC-209 + HCQ	0,7 µM	0,96 µM
HCQ + PTC-209	88 µM	111 µM

Tabela 8. Ocena oddziaływań między PRT4165 lub PTC-209 w kombinacji z inhibitorami autofagii Lys05 i HCQ na podstawie wyliczonego współczynnika CI dla komórek HEC-1A i Ishikawa.

	HEC-1A		Ishikawa	
	CI	oddziaływania	CI	oddziaływania
PRT4165 + Lys05	1,41	umiarkowany antagonizm	1,72	antagonizm
PRT4165 + HCQ	1,71	antagonizm	2,59	antagonizm
PTC-209 + Lys05	2,12	antagonizm	0,88	niewielki synergizm
PTC-209 + HCQ	1,7	antagonizm	3,05	antagonizm

7.6. Określenie wpływu zahamowania aktywności RING1A/B i BMI-1 w kombinacji z Lys05 na apoptozę i nekroptozę

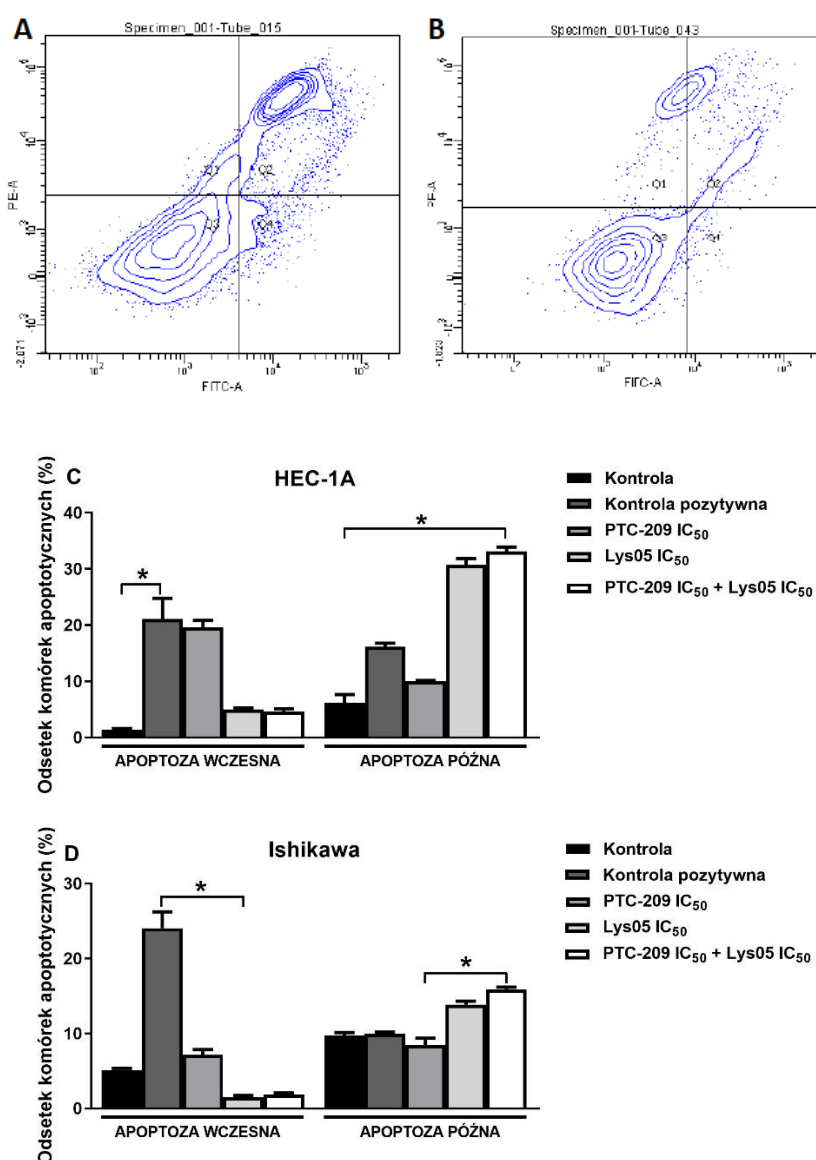
W celu określenia wpływu inhibitorów kompleksu PRC1 oraz lizosomów na poziom apoptozy komórek wykonano analizę cytometryczną z użyciem barwników fluorescencyjnych. W przeprowadzonych eksperymentach jako inhibitor lizosomów wykorzystano tylko Lys05 ze względu na dziesięciokrotnie większą efektywność niż HCQ. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano komórki traktowane kamptotecyną. Uzyskane wyniki wskazują, że traktowanie PRT4165 i Lys05 pojedynczo wpływa na wzrost odsetka komórek HEC-1A we wczesnej i późnej fazie apoptozy względem kontroli. Ponadto zaobserwowano niższy odsetek komórek we wczesnej apoptozie po traktowaniu kombinacją PRT4165 i Lys05 w porównaniu do kontroli pozytywnej i pojedynczego traktowania PRT4165 (**Ryc. 19C**). W komórkach Ishikawa obserwuje się niższy odsetek komórek we wczesnej apoptozie po traktowaniu Lys05 w porównaniu do kontroli pozytywnej (**Ryc. 19D**). Dodatkowo wykazano wyższy odsetek komórek w późnej fazie apoptozy niż we wczesnej fazie po traktowaniu Lys05 i kombinacją związków.



Rycina 19. Wyniki analizy wpływu PRT4165, Lys05 oraz ich kombinacji na poziom apoptozy komórek (A-D). Przykładowe histogramy przedstawiające zawartość komórek żywych (Q3), nekrotycznych (Q1) oraz we wczesnej (Q4) i późnej (Q2) fazie apoptozy po traktowaniu odpowiednimi związkami dla komórek HEC-1A (**A**) oraz Ishikawa (**B**). Odsetek komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy 48 godzin po traktowaniu PRT4165 i Lys05 pojedynczo i w kombinacji dla komórek HEC-1A (**C**) oraz Ishikawa (**D**). Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

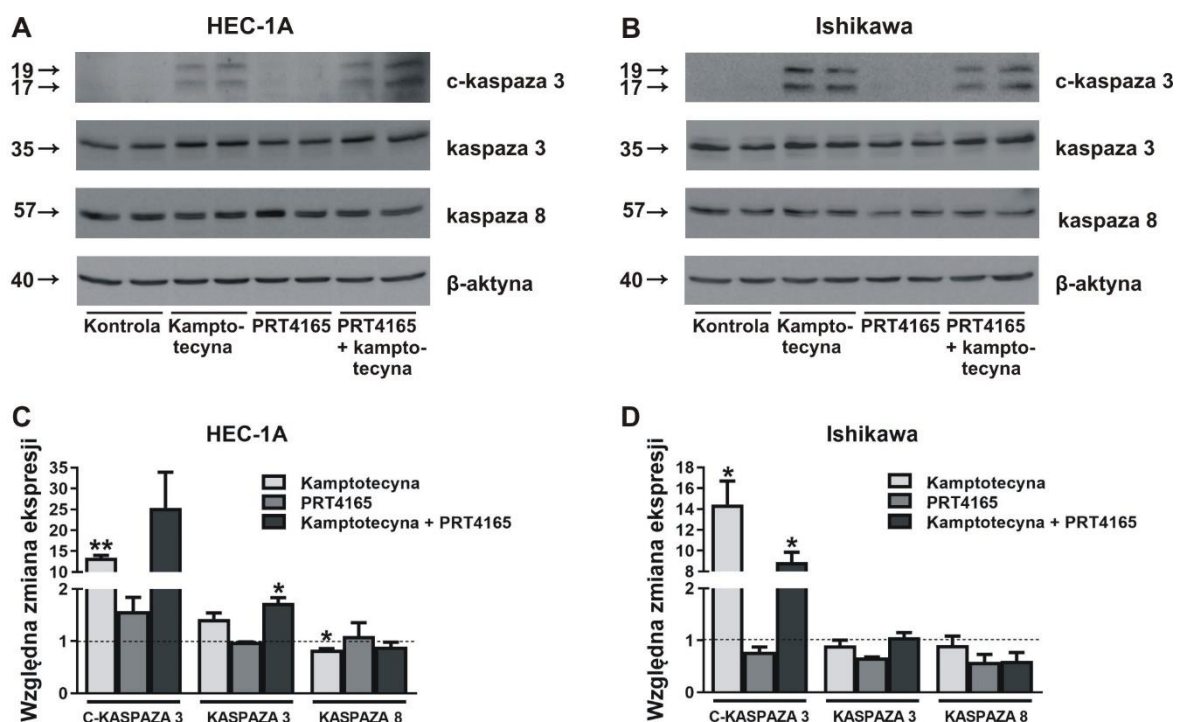
Przeprowadzono analogiczny eksperyment wykorzystując PTC-209, Lys05 oraz kombinację obu związków w celu sprawdzenia ich wpływu na apoptozę w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Obserwuje się zwiększony odsetek komórek HEC-1A we wczesnej fazie apoptozy po traktowaniu kamptotecyną i PTC-209 względem kontroli, a także wyższy odsetek komórek w późnej apoptozie po traktowaniu Lys05 i kombinacją obu związków (**Ryc. 20C**). W przypadku komórek Ishikawa zaobserwowano spadek odsetka komórek we

wczesnej apoptozie po traktowaniu Lys05 oraz kombinacją związków. Ponadto wykazano także wzrost odsetka komórek w późnej fazie apoptozy po traktowaniu PTC-209 i Lys05 względem pojedynczego traktowania PTC-209 (**Ryc. 20D**). Obserwuje się także znaczący wzrost odsetka komórek w późnej apoptozie względem komórek we wczesnej fazie po traktowaniu Lys05 i kombinacją związków.



Rycina 20. Wyniki analizy wpływu PTC-209, Lys05 oraz ich kombinacji na poziom apoptozy komórek (A-D). Przykładowe histogramy przedstawiające zawartość komórek żywych (Q3), nekrotycznych (Q1) oraz we wczesnej (Q4) i późnej (Q2) fazie apoptozy po traktowaniu odpowiednimi związkami dla komórek HEC-1A (**A**) oraz Ishikawa (**B**). Odsetek komórek we wczesnej i późnej fazie apoptozy 48 godzin po traktowaniu PTC-209 i Lys05 pojedynczo i w kombinacji dla komórek HEC-1A (**C**) oraz Ishikawa (**D**). Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

W komórkach traktowanych PRT4165 analizowano poziom kaspazy 3 i jej formy ciętej. Jako induktor apoptozy wykorzystano kamptotecynę. Wykazano widoczne wzrosty poziomu ciętej formy kaspazy 3 w obu liniach komórkowych po traktowaniu kamptotecyną oraz kombinacją kamptotecyny z PRT4165 (**Ryc. 21A, 21B**). Analiza densytometryczna w komórkach HEC-1A wykazała niewielki wzrost ekspresji ciętej kaspazy 3 po traktowaniu PRT4165 względem kontroli, nie obserwuje się tego w komórkach Ishikawa.

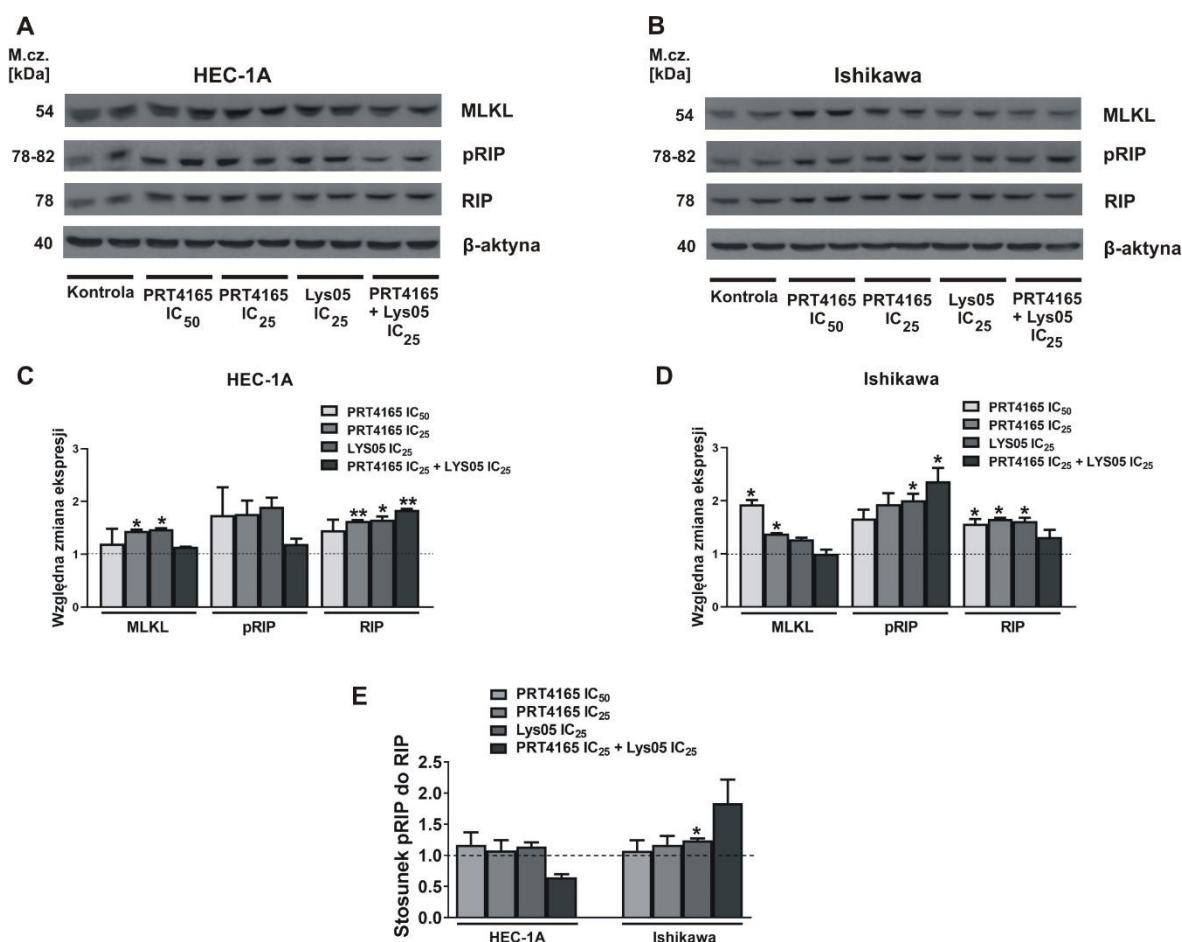


Rycina 21. Ocena wpływu PRT4165 oraz kamptotecyny na apoptozę w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji ciętej kaspazy 3, kaspazy 3 i kaspazy 8 24 godziny po traktowaniu kamptotecyną w stężeniu 5 μ M dla komórek HEC-1A oraz 6 godzin po traktowaniu kamptotecyną w stężeniu 5 μ M dla komórek Ishikawa (**A, B**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek przedstawione jak względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**C, D**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ponieważ zmiany w ilości kaspaz po traktowaniu PRT4165 w obu liniach komórkowych nie były istotne, postanowiono sprawdzić wpływ inhibitora na ekspresję białek związanych z procesem nekroptozy – RIP i jego fosforylowanej formy oraz MLKL.

Uzyskane wyniki wskazują, że traktowanie PRT4165 wpływa na wzrost ilości białek RIP i MLKL w obu liniach komórkowych (**Ryc. 22A, 22B**). Podobny efekt, choć w mniejszym stopniu, obserwuje się po zastosowaniu Lys05, jednak w wyniku traktowania komórek kombinacją związków ilość obu białek jest mniejsza. Zwiększony stosunek fosforylowanej

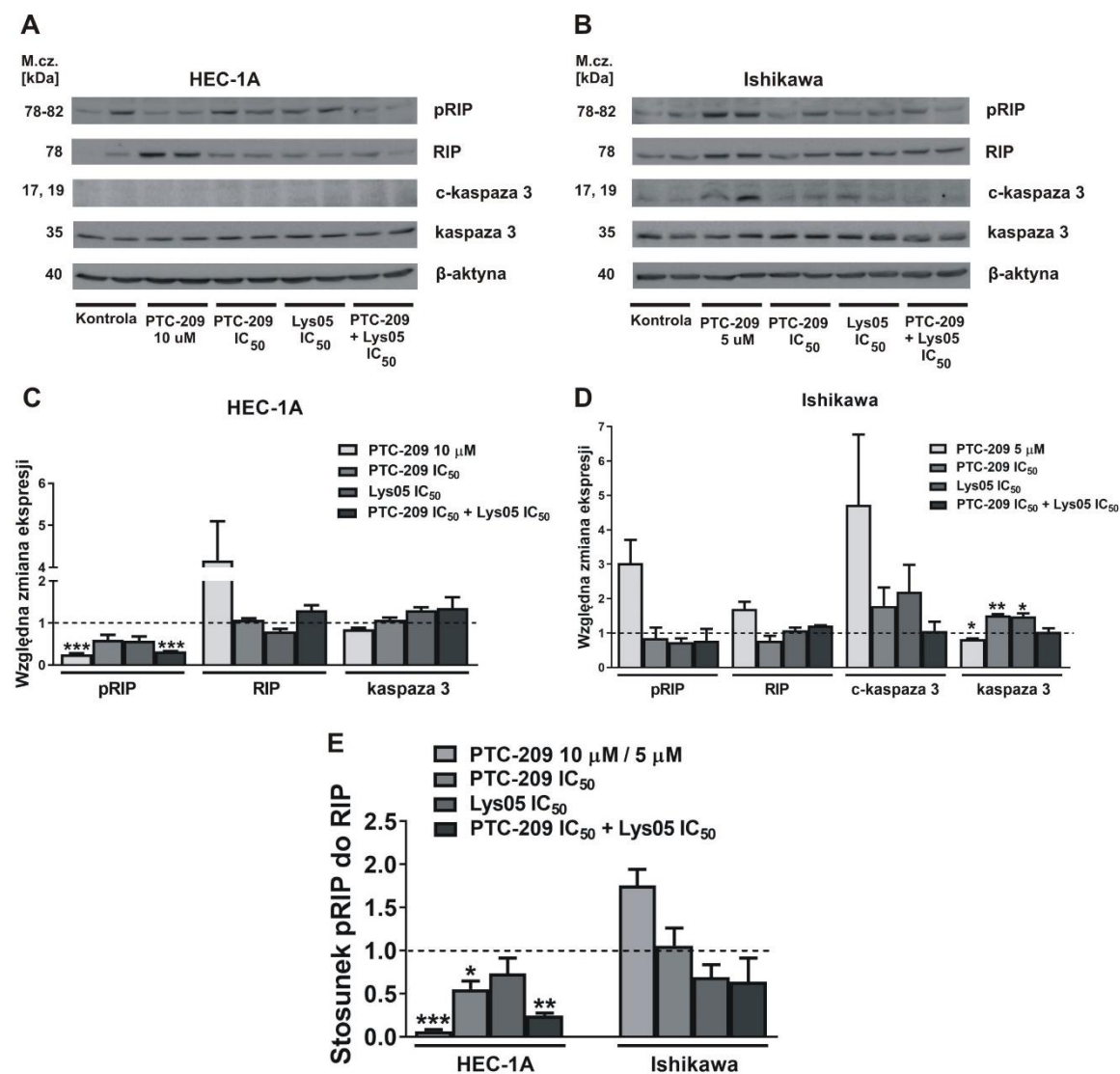
formy białka RIP do RIP obserwuje się po traktowaniu Lys05 w komórkach Ishikawa (Ryc. 22E).



Rycina 22. Ekspresja białek zaangażowanych w proces nekroptozy po traktowaniu PRT4165 i Lys05 w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji pRIP, RIP i MLKL 48 godzin po traktowaniu PRT4165 w stężeniu IC₅₀ i IC₂₅ (40 μ M dla HEC-1A; 16 μ M dla Ishikawa), Lys05 w stężeniu IC₂₅ (10,5 μ M dla HEC-1A, 6,4 μ M dla Ishikawa) oraz kombinacji PRT4165 i Lys05 w stężeniach IC₂₅ dla danej linii komórkowej (**A, B**). Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek przedstawione jak względna zmiana ekspresji w stosunku do kontroli (**C, D**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Stosunek fosforylowanej formy białka RIP do RIP (**E**).

Określono wpływ zahamowania ekspresji *BMI1* z użyciem PTC-209 w kombinacji z inhibitorem autofagii Lys05 na ekspresję białek zaangażowanych w apoptozę i nekroptozę. Wyniki analizy wykazały, że traktowanie komórek obu linii wysokimi stężeniami PTC-209 przyczynia się do wzrostu ekspresji białka RIP3, ale w komórkach HEC-1A dochodzi do wyraźnego spadku fosforylacji tego białka (**Ryc. 23A**). W obu typach komórek zastosowanie PTC-209 w kombinacji z Lys05 wpływa na zmniejszenie ilości puli fosforylowanego RIP

w odniesieniu do jego całkowitej ilości. W komórkach Ishikawa zaobserwowano wzrost poziomu ciętej kaspazy 3 po traktowaniu PTC-209 w stosunku do kontroli, ale nie obserwuje się tego po traktowaniu komórek PTC-209 w połączeniu z Lys05 (**Ryc. 23B**).



Rycina 23. Ekspresja białek zaangażowanych w proces apoptozy i nekroptozy po traktowaniu PTC-209 i Lys05 w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji pRIP, RIP, ciętej kaspazy 3, kaspazy 3 48 godzin po traktowaniu PTC-209 w stężeniu 10 μ M dla HEC-1A i 5 μ M dla Ishikawa oraz IC₅₀, Lys05 w stężeniu IC₅₀ oraz kombinacji PTC-209 z Lys05 w stężeniach IC₅₀ dla danej linii komórkowej. Na rycinie przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń (**A**, **B**). Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białek przedstawione jako względna zmiana ekspresji (**C**, **D**); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Stosunek fosforylowanej formy białka RIP do RIP (**E**)

8. Dyskusja

Pomimo intensywnych badań i postępu w leczeniu chorób nowotworowych odnotowuje się ciągły wzrost zachorowań. Wśród najczęściej diagnozowanych nowotworów ginekologicznych u kobiet wyróżnia się raka endometrium. Ponieważ pacjentki z rakiem endometrium są często diagnozowane we wczesnym stadium choroby rokowanie u nich jest stosunkowo dobre w porównaniu z innymi nowotworami ginekologicznymi, jednak pomimo tego na świecie rocznie umiera około 90 000 pacjentek [211, 212]. W przypadku leczenia nowotworu zwykle stosuje się chemioterapię ogólnoustrojową, jednak schemat chemioterapii dla raka endometrium pozostaje ograniczony [211, 212]. Wciąż poszukuje się nowych chemioterapeutyków, które indukując lub hamując określone mechanizmy komórkowe wykazywałyby skuteczniejsze działanie przeciwnowotworowe. Jednym z tych procesów jest autofagia, która pełni zarówno funkcję promującą przeżycie jak i śmierć komórki. W odpowiedzi na stres lub uszkodzenia, dochodzi do indukcji autofagii, która zatrzymuje procesy anaboliczne, aby utrzymać komórki przy życiu, jednak nadmierna autofagia prowadzi do ich śmierci. Regulacja autofagii jest związana z etiopatogenezą kilku chorób, w tym nowotworów, ale jej rola jest niejednoznaczna. Wykazano, że autofagia hamuje rozwój nowotworów, zwłaszcza we wczesnych stadiach inicjacji. Większość białek biorących udział w indukcji autofagii hamuje onkogenezę. Co więcej, wiele genów związanych z autofagią jest nieaktywnych w różnych typach nowotworów lub ich aktywność jest obniżona [213]. Z drugiej strony, w późnych stadiach rozwoju nowotworu autofagia jest mechanizmem wspierającym progresję i przerzuty [214]. Podczas rozwoju nowotworu komórki znajdują się w stanie hipoksji i stresu oksydacyjnego z powodu braku unaczynienia [215]. W takich warunkach autofagia przyczynia się do powstania komórek nowotworowych opornych na terapię przeciwnowotworowe i o dużym potencjale do przerzutów [214]. Chociaż w literaturze można znaleźć liczne informacje na temat cytoplazmatycznych czynników i procesów regulujących autofagię, molekularne podstawy epigenetycznej regulacji autofagii nie zostały do końca wyjaśnione [216]. Represyjne kompleksy Polycomb są ważnymi epigenetycznymi regulatorami, które wpływają na ekspresję genów poprzez modyfikacje histonów. Zależność pomiędzy autofagią a EZH2, która jest składnikiem kompleksu PRC2 jest dość dobrze przebadana w kontekście nowotworów. Wykazano, że zahamowanie ekspresji EZH2 wpływa na indukcję autofagii w komórkach raka jelita grubego [217], raka trzustki [218], żołądka [219] oraz pęcherza moczowego [220]. Znacznie mniej wiadomo o wpływie składników kompleksu PRC1 na

proces autofagii. W literaturze biochemicznej istnieją nieliczne doniesienia wiążące spadek ekspresji BMI-1 z indukcją autofagii. Wu i wsp. wykazali, że wyciszenie BMI-1 przy jednoczesnym zastosowaniu 5-florouracylu może wpływać na indukcję autofagii w komórkach raka wątroby [156]. Badania przeprowadzone przez Dey i wsp. wykazały indukcję procesu autofagii w komórkach raka jajnika OVCAR4 i CP20 z wyciszoną ekspresją *BMI1* [154]. Aktywność RING1A/B była natomiast łączona z zaangażowanym w autofagię białkiem AMBRA1. AMBRA1 odpowiada za aktywację i stabilizację kompleksu beklina 1-Vps34, promując tworzenie autofagosomu [221, 222]. Xia i wsp. wykazali, że RING1B wpływając na ubikwitynylację białka AMBRA1 prowadzi do obniżenia autofagii w mysich fibroblastach [158].

W prezentowanej pracy przeprowadzono badania mające na celu określenie wpływu wyciszenia lub zahamowania aktywności białek RING1A/B i BMI-1 na ekspresję genów związanych z autofagią w komórkach raka endometrium HEC-1A i Ishikawa. Wykazano, że wyciszenie *RING1* oraz *RNF2* metodą interferencji RNA powoduje pewne zmiany w ekspresji genów powiązanych z autofagią na poziomie mRNA, jednak z nielicznymi wyjątkami brak jest znacznych zmian na poziomie białka. Może to częściowo wynikać z redundancji funkcjonalnej produktów genów *RING1* i *RNF2* oraz potranslacyjnych mechanizmów regulacyjnych, przede wszystkim długiego okresu półtrwania białka. Zaobserwowano natomiast wzrost ilości białka uznawanego za marker dla procesu autofagii – LC3B po wyciszeniu *RNF2* w komórkach HEC-1A oraz wyciszeniu *RING1* w komórkach Ishikawa. Ponadto stwierdzono, że wyciszenie *RNF2* prowadzi do wyraźnego wzrostu ekspresji RING1A w komórkach, chociaż nie obserwuje się odwrotnej zależności. W literaturze istnieją doniesienia sugerujące funkcjonalną redundancję RING1A i RING1B w embrionalnych nerwowych komórkach macierzystych [223] i zarodkach przedimplantacyjnych [224]. Inaktywacja dowolnego paralogu wpływa na obniżenie globalnego poziomu ubikwitynylacji lizyny 119 histonu H2A, jednak jej największy spadek obserwuje się w przypadku utraty aktywności obu białek [225, 226]. Z drugiej strony wydaje się, że RING1B pełni dominującą rolę w kompleksie PRC1. W badaniach z wykorzystaniem modelu myszy z nokautem *RING1* i *RNF2* stwierdzono, że utrata RING1A skutkuje niewielkimi zmianami w strukturze szkieletowej mysich embrionów, natomiast utrata RING1B jest związana z wczesną letalnością embrionów [227, 228].

W celu zahamowania katalitycznej aktywności RING1A i RING1B wykorzystano syntetyczny inhibitor PRT4165. Związek ten hamuje aktywność ligazy ubikwityny E3 zarówno RING1A jak i RING1B, ale nie wykazuje specyficzności względem innych ligaz

np. RNF6 czy RNF168 [229]. W obecności PRT4165 ubikwitynylacja histonu H2A może zostać całkowicie zahamowana niezależnie od tego czy *RING1* czy *RNF2* przyczyniają się do aktywności ligazy ubikwitynowej E3 [229]. W literaturze biochemicznej brak jest informacji na temat wpływu PRT4165 na proces autofagii. Przeprowadzone w pracy badania wykazały w komórkach Ishikawa traktowanych PRT4165 wzrost poziomu formy LC3B oraz spadek poziomu białka p62, kolejnego charakterystycznego markera dla procesu autofagii. Białko p62 jest pierwszym wyselekcjonowanym adaptatorem autofagii odkrytym u ssaków. Jego nazwa (ang. *sequestosome 1*) wynika ze zdolności do tworzenia agregatów. Wewnątrzkomórkowy poziom białka p62 zależy od regulacji transkrypcji i potranskrypcyjnej degradacji w procesie autofagii [230]. Funkcjonalne znaczenie p62 określono dopiero gdy Komatsu i wsp. wykazali związek między p62 a LC3, wskazując na rolę p62 w autofagii. W badaniach stwierdzono, że p62 pośredniczy w tworzeniu białkowych agregatów, co sugerowało, że p62 ułatwia selektywną degradację ładunku białkowego podczas autofagii [231]. Obecnie wiadomo, że p62 działa jako adaptator wiążąc agregaty ubikwitynylowanych białek i dostarczając je do autofagosomów [232]. W wyniku zahamowania autofagii dochodzi do kumulacji p62, a podczas indukcji autofagii obserwuje się obniżony poziom białka, dlatego też p62 można stosować jako marker procesu [233]. Zatem w komórkach Ishikawa zastosowanie PRT4165 przyczynia się do indukcji autofagii, czego nie obserwuje się w komórkach HEC-1A. Podobne rezultaty uzyskano po wyciszeniu BMI-1, które jest kolejnym istotnym białkiem wchodzącym w skład kompleksu PRC1. BMI-1 jest kluczowe dla funkcjonowania kompleksu PRC1 pełniąc funkcję regulującą aktywność ligazy E3 białka RING1B [8, 106]. Uważa się, że BMI-1 odgrywa ważną rolę w proliferacji, nieśmiertelnieniu i starzeniu się komórek [9]. Jego nadekspresję obserwuje się w wielu typach nowotworów w tym raku piersi, jajnika, jelita grubego czy prostaty. Co więcej, nieprawidłowa ekspresja BMI-1 została istotnie skorelowana z klinicznym stopniem zaawansowania nowotworu. Badania sugerują, że BMI-1 może być zaangażowany w hamowanie autofagii w niektórych komórkach nowotworowych.

W ramach pracy do zahamowania ekspresji białka BMI-1 wykorzystano także inhibitor PTC-209. Zaobserwowano spadek ekspresji BMI-1 na poziomie białka przy jednoczesnym wzroście ekspresji na poziomie transkryptu w obu liniach komórkowych. PTC-209 hamuje translację białka BMI-1, a zmniejszenie ilości białka może stanowić sygnał dla komórki do uruchomienia mechanizmu wpływającego na aktywację transkrypcji. Mayr i wsp. uzyskali podobne wyniki po zastosowaniu PTC-209 w komórkach raka dróg żółciowych [234]. W wyniku zmniejszenia poziomu BMI-1 obserwuje się zmiany ekspresji markerów autofagii

na poziomie mRNA oraz białka w obu liniach komórkowych. Badania przeprowadzone przez Zhang i wsp. oraz Wang i wsp. wykazały, że zahamowanie ekspresji BMI-1 prowadzi do aktywacji szlaku AMPK-mTOR, wzrostu ekspresji LC3B i w konsekwencji aktywacji autofagii w raku pęcherza moczowego i w mysich ksenograftach [235, 236].

W komórkach ssaków głównymi regulatorami autofagii są czynniki hormonalne i odżywcze. Wśród nich najbardziej dokładnie zbadano regulację przez aminokwasy i insulinę oraz ich szlaki sygnalizacyjne [237]. Wiedza na temat wpływu innych składników odżywczych jest ograniczona. Powszechnie wiadomo, że niedobór glukozy jest czynnikiem indukującym autofagię, jednak wpływ jej niedoboru na komórki nowotworowe jest stosunkowo mniej zbadany [238]. W związku z tym sprawdzono wpływ głodzenia na proces autofagii w komórkach kontrolnych HEC-1A i Ishikawa oraz traktowanych PRT4165 lub PTC-209. Stwierdzono, że zmniejszenie stężenia glukozy w porównaniu do komórek hodowanych w standardowym stężeniu (hiperglikemia) powoduje wzrost LC3A/B oraz p62 na poziomie transkryptu i białka. Co ciekawe w warunkach hipoglikemii wyraźnie zmniejsza się poziom białka RING1A w komórkach HEC-1A i RING1B w komórkach Ishikawa. Spadkowi w ilości białka towarzyszy wzrost na poziomie mRNA, co może świadczyć o zwiększonej degradacji białka. W komórkach Ishikawa stwierdzono spadek poziomu białka p62, ale towarzyszy mu wyraźny wzrost na poziomie mRNA i nie ma zwiększenia ilości LC3B, które bardzo wyraźne jest w komórkach hodowanych w warunkach wysokiego stężenia glukozy. Wyniki te sugerują, że w przeciwieństwie do warunków hiperglikemii PRT4165 nie ma znaczenia dla indukcji autofagii w komórkach Ishikawa hodowanych w warunkach hipoglikemii. W warunkach hipoglikemii po traktowaniu PTC-209 obserwuje się wyraźne zmniejszenie poziomu mRNA badanych genów, szczególnie w komórkach Ishikawa. W komórkach HEC-1A zaobserwowano spadek poziomu białka p62 przy wzroście na poziomie mRNA i widocznym zmniejszeniu ilości białka LC3B względem wyniku uzyskanego w warunkach wysokiego stężenia glukozy. Można więc sugerować, że stosowanie inhibitorów kompleksu PRC1 w warunkach hipoglikemii zmniejsza ich skuteczność w indukowaniu autofagii. Może być to związane z ogólną tendencją komórek nowotworowych do bycia mniej wrażliwymi na stosowane w terapiach związki. Bhattacharya i wsp. w badaniach przeprowadzonych na komórkach raka żołądka wykazali, że hipoglikemia zwiększała oporność na związki cytotoksyczne, zwłaszcza w komórkach silnie zależnych od glikolizy. W warunkach obniżonego stężenia glukozy komórki wykazywały większą oporność na 5-fluorouracyl i karboplatynę niż w wysokim stężeniu

glukozy, co może sugerować, że pozakomórkowe poziomy glukozy mogą wpływać na wrażliwość na leki [239].

Kompleks PRC1 odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów poprzez ubikwitynylację lizyny 119 histonu H2A [8]. W prezentowanej pracy warunkach wyciszenia *RING1/RNF2* lub *BMI1* wykazano bardzo wyraźny spadek ubikwitynylacji histonu H2A w komórkach Ishikawa. W komórkach HEC-1A spadek ubikwitynylacji był widoczny tylko w komórkach traktowanych inhibitorami w warunkach hipoglikemii. W wyniku traktowania PTC-209 obserwuje się nawet wzrost poziomu H2AK119Ub w komórkach HEC-1A hodowanych w warunkach wysokiego stężenia glukozy, co może być skutkiem wzrostu ekspresji *RING1A* spowodowanym reakcją komórki na niedobór *RING1B*. Zatem uzyskane wyniki sugerują odmienny wpływ zahamowania aktywności białek kompleksu PRC1 na ekspresję genów związanych z autofagią w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa. Na obecnym etapie badań nie można jednoznacznie stwierdzić co jest przyczyną różnego wpływu inhibitorów na komórki HEC-1A i Ishikawa, ale jednym z powodów może być odmienny kontekst molekularny obu typów komórek. Szlak sygnalizacyjny PI3K/Akt/mTOR jest kluczowym regulatorem procesu autofagii [240]. Serynowo-treoninowa kinaza AKT jest główny efektem 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) i może być aktywowana w wyniku stymulacji komórek czynnikami wzrostu, cytokinami czy insuliną. Zwiększoną ekspresję i aktywację AKT stwierdzono w wielu nowotworach człowieka, która może wynikać z amplifikacji genu PI3K czy utraty aktywności fosfatazy PTEN. Fosfataza PTEN jest jednym z negatywnych regulatorów szlaku kinazy AKT, wpływa na defosforylację fosfatydyloinozytolu-3,4,5-trifosforanu (PIP3) do PIP2 prowadząc pośrednio do defosforylacji kinazy AKT [241]. Za bezpośrednią defosforylację kinazy AKT odpowiadają fosfatazy PHLPP1 i 2 [242]. W literaturze biochemicznej istnieją doniesienia wskazujące na brak ekspresji białka PTEN w komórkach Ishikawa. Wan i wsp. wykazali, że w komórkach Ishikawa istnieją dwa warianty transkrypcyjne genu *PTEN*. W wyniku delecji w obrębie kodonu 289 w wariantie pierwszym i delecji w obrębie kodonu 318-319 w wariantie drugim dochodzi do utworzenia kodonu STOP w wyniku czego powstaje transkrypt, ale nie powstaje białko [243]. Wyniki wcześniejszych badań uzyskane przez nasz zespół wykazały ekspresję białka PTEN w komórkach HEC-1A oraz potwierdziły brak ekspresji w komórkach Ishikawa. W obu liniach komórkowych traktowanych PTC-209 wykazano spadek ekspresji białka BMI-1, któremu towarzyszył spadek poziomu fosforylacji AKT przy jednoczesnym wzroście ekspresji fosfataz PHLPP1 i 2. Sugeruje to, że BMI-1 może

wpływać na aktywność AKT nie tylko przez regulację PTEN, ale także poprzez regulację genów PHLPP [244].

Autofagia pełni zarówno funkcję promującą przeżycie, jak i śmierć komórki. W odpowiedzi na stres lub uszkodzenia indukowana jest autofagia, która zatrzymuje procesy anaboliczne, aby utrzymać komórki przy życiu. Jednak nadmierna autofagia prowadzi do śmierci komórki. Ważnym pytaniem pozostającym bez odpowiedzi jest czy lepiej powstrzymać tworzenie się autofagosomów, czy też blokować ich degradację za pomocą inhibitorów lizosomów. Mimo postępów w leczeniu nowotworów, oporność komórek na leki nadal pozostaje głównym problemem w projektowaniu skutecznych terapii. Dlatego też coraz powszechniej stosuje się schematy leczenia przeciwnowotworowego oparte na skojarzeniu kilku substancji. Wykazano, że PRT4165 hamuje monoubikwitynylację białek przez RING1B oraz synergistycznie obniża zdolność proliferacji nowotworów w połączeniu z innymi lekami takimi jak taxol czy doksorubicyna [245, 246]. W badaniach przeprowadzonych przez Elango i wsp. wykazano, że PTC-209 w połączeniu z palbocyklibem skuteczniej zmniejszały żywotność oraz migrację komórek raka piersi, jelita i prostaty. Ponadto, kombinacja obu związków hamowała formowanie się guzów w mysim modelu *in vivo*, które były odpowiednio większe u myszy traktowanych pojedynczym związkiem [247]. W literaturze nie ma danych na temat zastosowania inhibitorów lub induktorów autofagii w połączeniu z inhibitorami kompleksu PRC1.

W związku z tym w przedstawionej pracy doktorskiej zastosowano PRT4165 lub PTC-209 zarówno pojedynczo, jak i w kombinacji z wybranymi induktorami oraz inhibitorami autofagii w celu sprawdzenia ich wpływu na żywotność komórek raka endometrium. Zaobserwowano większą wrażliwość komórek Ishikawa na inhibitory białek kompleksu PRC1, o czym świadczy dużo niższe stężenie związków niezbędne do uzyskania 50% spadku żywotności komórek.

Jako induktory autofagii wyodrębniono dwa związki – metforminę i Torin1. Metformina jest jedną z lepiej przebadanych substancji. Stosowana jest przede wszystkim do leczenia cukrzycy typu II, jednak liczne badania wykazały, że posiada także aktywność proapoptotyczną oraz przez aktywację szlaku AMPK wpływa na indukcję autofagii. Li i wsp. sugerują, że metformina indukuje zahamowanie cyklu komórkowego, apoptozę oraz autofagię poprzez szlak JNK/c-Jun zależny od reaktywnych form tlenu w ludzkim kostniakomięsaku [248]. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. wskazują, że metformina efektywnie hamuje proliferację poprzez indukcję autofagii i zahamowanie cyklu komórkowego w liniach komórkowych szpiczaka mnogiego oraz w mysich ksenograftach

[249]. Ponadto, wyniki badań Chen i wsp. wykazały wzrost poziomu LC3B, zahamowanie migracji oraz cyklu komórkowego w komórkach raka trzustki, a jednocześnie zastosowanie metforminy i pivastatinu wskazuje na oddziaływania synergistyczne między związkami [250]. Takahashi i wsp. wykazali po traktowaniu metforminą komórek Ishikawa znaczny spadek żywotności oraz proliferacji komórek, zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1 i G2/M, a także indukcję autofagii oraz zwiększenie poziomu apoptozy indukowanej zarówno przez szlak zewnętrzny jak i wewnętrzny [182]. Podobne wyniki uzyskali inni badacze, którzy potwierdzili indukcję autofagii w komórkach Ishikawa traktowanych metforminą [251, 252]. Torin1 jest inhibitorem szlaku kinazy mTOR, który bezpośrednio hamuje oba kompleksy prowadząc do upośledzenia wzrostu i proliferacji komórek w znacznie większym stopniu niż rapamycyna [253]. Park i wsp. wykazali, że zastosowanie Torin1 w komórkach raka wątroby indukuje śmierć komórek w warunkach normoksji, a jego cytotoksyczność w warunkach hipoksji była znacznie zwiększona w porównaniu do warunków prawidłowych. Ponadto, traktowanie Torin1 wpływa na wzrost poziomu LC3B indukując autofagię, a także obniża poziom BNIP3 zwiększając śmiertelność niedotlenionych komórek nowotworowych [254]. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. wykazały, że zastosowanie Torin1 w połączeniu z nitazoksanidem (NTZ) wpływa na wzrost żywotności komórek glejaka LN229 w porównaniu z samym NTZ. Analiza cyklu komórkowego wykazała, że Torin1 i NTZ w mniejszym stopniu wpływają na zahamowaniu fazy G0/G1 niż traktowanie tylko NTZ [255].

W prezentowanej pracy stwierdzono, że w komórkach raka endometrium stosowanie inhibitorów białek kompleksu PRC1 w połączeniu z metforminą i Torin1 nie wpływa na zwiększenie ich skuteczności w obniżaniu żywotności komórek. Współczynnik CI wyliczony dla kombinacji stosowanych związków wskazuje na ich efekt antagonistyczny. Zatem stosowanie inhibitorów PRC1 w połączeniu z aktywatorami autofagii nie stanowi obiecującej strategii przeciwnowotworowej w przypadku raka endometrium.

W literaturze pojawia się coraz więcej doniesień, że hamowanie autofagii może być skutecznym podejściem w leczeniu zaawansowanych nowotworów. W guzach ze wzmocnioną autofagią jako mechanizmem utrzymującym komórki przy życiu, hamowanie autofagii może tłumić zdolność komórek nowotworowych do przetrwania w warunkach komórkowego stresu metabolicznego czyniąc je bardziej podatnymi na inicjowanie mechanizmów śmierci komórkowej. Obecnie spośród wielu związków, które hamują różne etapy autofagii, jedynymi klinicznie dostępnymi lekami stosowanymi do jej hamowania są chlorochina i hydroksychlorochina. Leki te wpływają na zmianę pH w lizosomach i blokując

ich fuzję z autofagosomami zapobiegają degradacji ładunku. Fukuda i wsp. wykazali, że jednoczesne traktowanie resweratolem i chlorochiną zmniejsza żywotność komórek Ishikawa, a zahamowanie autofagii z użyciem chlorochiny zwiększa apoptozę indukowaną resweratolem [256]. Badania He i wsp. wykazały zarówno indukcję apoptozy i autofagii przez chryzynę w komórkach HEC-1A i Ishikawa, a dodatkowe zastosowanie chlorochiny nasiliło apoptozę i zwiększyło zahamowanie proliferacji komórek, sugerując, że autofagia indukowana chryzyną, pełniła funkcję cytoprotekcyjną [257]. Wyniki badań przedklinicznych przedstawione przez Cook i wsp. sugerują, że jednoczesne zastosowanie HCQ i tamoksifenu w liniach komórkowych raka piersi z ekspresją receptora estrogenowego daje lepsze efekty i skuteczniej hamuje autofagię niż użycie tych związków pojedynczo [258]. Wyniki przedklicznych badań *in vitro* i *in vivo* stanowiło uzasadnienie dla rozpoczęcia badań klinicznych nad nowotworami [214]. Ponieważ długotrwałe stosowanie chlorochiny wywoływało poważne skutki uboczne, w badaniach klinicznych najczęściej stosuje się hydroksychlorochinę, jednak cały czas poszukuje się nowych, coraz bardziej efektywnych związków. Lys05 wykazuje dziesięciokrotnie silniejsze działanie niż HCQ [204]. Badania przeprowadzone przez DeVorkin i wsp. wykazały, że jednoczesne zastosowanie Lys05 i sunitynibu w jasnokomórkowym raka jajnika powoduje znaczny spadek żywotności komórek w warunkach normoksji i hipoksji w porównaniu z użyciem samego sunitynibu. Ponadto stwierdzono, że kombinacja obu związków wpływa na indukcję apoptozy [205]. Vijayaraghavan i wsp. wykazali, że leczenie kombinacją palbocyklibu i Lys05 znacznie zmniejszyło objętość guza u myszy powstałego na bazie linii komórkowej MCF7-T odpornej na tamoksifen, co skutkowało mniejszymi guzami i przedłużonym przeżyciem w porównaniu z kontrolami z nośnikiem lub pojedynczym leczeniem [259].

W prezentowanej pracy stwierdzono, że PRT4165 w kombinacji z Lys05 i HCQ wykazuje działanie antagonistyczne w obu liniach komórkowych. Podobne wyniki uzyskano w przypadku kombinacji inhibitorów autofagii z PTC-209. Niewielki efekt synergistyczny uzyskano jedynie w komórkach Ishikawa po zastosowaniu kombinacji PTC-209 z Lys05.

Struktury autofagosomalne mogą służyć jako swoiste rusztowania do indukowania apoptozy lub nekroptozy, dlatego też indukcja początkowych etapów autofagii wraz z hamowaniem lizosomów może potencjalnie powodować aktywację obu tych procesów [260].

Apoptoza to mechanizm zaprogramowanej śmierci komórki. Kaspazy, należące do rodziny proteaz kwasu cysteinowego są centralnymi regulatorami apoptozy. Kaspaza 3 jest krytycznym czynnikiem wywołującym apoptozę, ponieważ jest częściowo lub całkowicie

odpowiedzialna za proteolityczne rozszczepienie wielu kluczowych białek takich jak polimeraza PARP (ang. *Poly (ADPribose) polymerase*) [261, 262].

Charakterystyczną cechą procesu apoptozy są zaburzenia asymetrii w rozmieszczeniu fosfolipidów błonowych. W prawidłowej komórce w zewnętrznej warstwie błony dominują fosfolipidy obojętne natomiast w warstwie wewnętrznej przeważają fosfolipidy anionowe m.in. fosfatydyloseryna [263]. Umierające komórki można scharakteryzować jako wczesne komórki apoptotyczne, ponieważ ich błona komórkowa pozostaje nienaruszona, ale na jej powierzchni dochodzi do ekspozycji fosfatydyloseryny umożliwiając rozpoznanie przez fagocyty. Komórki we wczesnej fazie apoptozy mogą stać się komórkami w późnej fazie gdy błona komórkowa dodatkowo staje się przepuszczalna. Bezpośrednia ekspozycja zdrowych, żywych komórek na urazy (wysoka temperatura, uszkodzenia mechaniczne i chemiczne) prowadzi do wytworzenia komórek nekrotycznych posiadających przepuszczalną błonę komórkową [264]. W pracy doktorskiej analizowano wpływ zastosowania związków na odsetek komórek apoptotycznych wykorzystując pomiar cytometryczny. Stwierdzono, że PRT4165 i PTC-209 w komórkach HEC-1A przyczyniają się do zwiększenia odsetka komórek apoptotycznych. Nie zaobserwowano jednak takiego wpływu inhibitorów na komórki Ishikawa. Ponadto stwierdzono, że kombinacja PRT4165 lub PTC-209 z Lys05 przyczynia się do zmniejszenia apoptozy w komórkach HEC-1A w porównaniu do komórek traktowanych pojedynczymi inhibitorami, co może częściowo tłumaczyć antagonistyczne działanie tych inhibitorów obserwowane w teście MTT.

Nekroptoza czyli programowana nekroza jest kolejną odmianą śmierci komórki. Nekroptoza jest negatywnie regulowana przez apoptozę za pośrednictwem kaspazy 8. Zahamowanie aktywności kaspaz prowadzi do rozpoczęcia nekroptozy. Następnie dochodzi do fosforylacji białka RIP w kilku miejscach (Ser14, Ser15, Ser161 i Ser166). RIP3 rekrutuje i aktywuje pseudokinazę MLKL (ang. *mixed lineage kinase domain-like protein*), czego następstwem jest śmierć komórki [265 – 267].

W literaturze biochemicznej brak jest informacji na temat wpływu stosowania inhibitorów kompleksu PRC1 razem z inhibitorami lizosomów na apoptozę lub nekroptozę. W prezentowanej pracy przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie czy PRT4165 lub PTC-209 oraz ich kombinacja z Lys05 wpływają na białka zaangażowane w oba procesy. Stwierdzono, że zastosowanie PRT4165 wpływa na ekspresję białek zaangażowanych w proces nekroptozy, zwłaszcza w komórkach Ishikawa. W wyniku traktowania kombinacją obu związków obserwuje się zmniejszoną ekspresję białek względem pojedynczych traktowań. Sugeruje to, że efekt uzyskany przez PRT4165 jest niwelowany przez Lys05.

Zastosowanie PTC-209 w połączeniu z Lys05 również nie wpływa na zwiększenie ekspresji białek związanych z nekroptozą, ponadto zaobserwowano istotny spadek stosunku białek pRIP do RIP w komórkach HEC-1A. Może to sugerować, że wpływ PTC-209 na kinazy związane z procesem nekroptozy jest większy gdy stosowany jest pojedynczo. Podobne wyniki dla PTC-209 uzyskali Dey i wsp. Wykazali, że traktowanie komórek PTC-209 w kombinacji odpowiednio z bafilomycyną A1 (inhibitor autofagii), Mdivi-1 (inhibitor mitofagii) oraz GSK'872 (inhibitor RIPK3) wpływa na zmniejszenie ilości białek pMLKL i RIPK3 względem traktowania tylko PTC-209 w liniach komórkowych CP20 i OVCAR4 [154].

Uzyskane w poniższej pracy wyniki wskazują na znaczenie białek kompleksu PRC1 w procesie autofagii i apoptozy/nekroptozy w komórkach raka endometrium. Zaobserwowano jednak, że ich wpływ jest zależny od rodzaju komórek. Zatem konieczne są dalsze badania w celu określenia konkretnego kontekstu molekularnego komórek, wpływającego na ich wrażliwość na stosowane związki. Ponadto wyniki wykazały istotne różnice w ekspresji genów związanych z autofagią i genów kodujących białka kompleksu PRC1 w zależności od stężenia glukozy, co stanowi przesłankę do rozszerzenia badań nad rolą białek kompleksu PRC1 w procesie autofagii o badania prowadzone w różnych warunkach dostępności składników odżywczych i prawdopodobnie hipoksji. Nie wykazano natomiast 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.

9. Podsumowanie

1. Wyciszenie ekspresji białek kompleksu PRC1 wpływa na zmianę ekspresji genów zaangażowanych w proces autofagii w komórkach raka endometrium HEC-1A i Ishikawa.
2. 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 B sugerować funkcjonalną redundancję.
3. Ekspresja genów zaangażowanych w proces autofagii jest zależna od stężenia glukozy. Warunki hipoglikemii przyczyniają się do obniżenia poziomu białka RING1A/B oraz wzrostu ekspresji na poziomie mRNA, co może wskazywać na zwiększoną degradację białka.

4. 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.
5. Zwiększenie ilości LC3B i spadek p62 po zastosowaniu inhibitora aktywności RING1A/B świadczy o indukcji autofagii w komórkach Ishikawa. Nie obserwuje się tego w komórkach HEC-1A.
6. Spadek poziomu ubikwitynylacji histonu H2A po wyciszeniu ekspresji/ zahamowaniu aktywności białek kompleksu PRC1 widoczny jest przede wszystkim w komórkach Ishikawa.
7. Zastosowanie inhibitorów kompleksu PRC1 zmniejsza żywotność komórek raka endometrium, przy czym komórki Ishikawa są zdecydowanie bardziej wrażliwe na stosowane inhibitory, o czym świadczy dużo niższe stężenie związków niezbędne do uzyskania 50% spadku żywotności.
8. Stosowanie inhibitorów kompleksu PRC1 przy jednoczesnym stosowaniu aktywatorów lub inhibitorów autofagii w większości przypadków wskazuje na ich działanie antagonistyczne.
9. PRT4165 przyczynia się do apoptozy komórek HEC-1A, ale nie komórek Ishikawa. W komórkach Ishikawa obserwuje się przede wszystkim wzrost ekspresji białek związanych z procesem nekroptozy.
10. Stosowanie kombinacji PRT4165 lub PTC-209 z Lys05 nie zwiększa skuteczności działania w indukcji apoptozy/ nekroptozy.

10. Wnioski

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pozwalają na stwierdzenie, że:

1. Zahamowanie aktywności RING1A/B ma różny wpływ na proces autofagii i apoptozy w obu typach komórek, co może być związane z odmiennym kontekstem molekularnym w obu liniach komórkowych. 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.
2. Zastosowanie inhibitora lizosomów w połączeniu z inhibitorami białek PRC1 nie zwiększa ich efektywności do indukowania apoptozy lub nekroptozy.
3. Zastosowanie inhibitorów kompleksu PRC1 razem z modulatorami procesu autofagii w większości przypadków wykazuje działanie antagonistyczne, wydaje się zatem, że stosowanie takiego połączenia nie stanowi obiecującej strategii antynowotworowej.

11. 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 dotyczy 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.

12. 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.

13. Bibliografia

1. Markowska A, Gryboś A, Marszałek A, et al. Expression of selected molecular factors in two types of endometrial cancer. *Adv Clin Exp Med*. 2021;30(10):1057-1064. doi:10.17219/acem/137383
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [published correction appears in *CA Cancer J Clin*. 2020 Jul;70(4):313]. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
3. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, et al. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up [published correction appears in *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl_4):iv167-iv168]. *Ann Oncol*. 2016;27(1):16-41. doi:10.1093/annonc/mdv484
4. Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, Jemal A. International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978-2013. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(4):354-361. doi:10.1093/jnci/djx214
5. Moore K, Brewer MA. Endometrial Cancer: Is This a New Disease?. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2017;37:435-442. doi:10.1200/EDBK_175666
6. Nuñez-Olvera SI, Gallardo-Rincón D, Puente-Rivera J, et al. Autophagy Machinery as a Promising Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:1326. Published 2019 Nov 29. doi:10.3389/fonc.2019.01326
7. Das CK, Mandal M, Kögel D. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(4):749-766. doi:10.1007/s10555-018-9727-z
8. Buchwald G, van der Stoop P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, Sixma TK. Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J*. 2006;25(11):2465-2474. doi:10.1038/sj.emboj.7601144
9. Zaczek A, Józwiak P, Krześlak A. Participation of BMI-1 protein in cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(0):811-824. doi:10.5604/01.3001.0010.4649
10. Ariosa AR, Lahiri V, Lei Y, et al. A perspective on the role of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021;1867(12):166262. doi:10.1016/j.bbadis.2021.166262

11. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*.2000;290(5497):1717-1721. doi:10.1126/science.290.5497.1717
12. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol*. 2018;20(3):233-242. doi:10.1038/s41556-018-0037-z
13. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*. 2016;3(12):588-596. Published 2016 Dec 1. doi:10.15698/mic2016.12.546
14. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2(Suppl 2):1542-1552. doi:10.1038/sj.cdd.4401765
15. Oku M, Sakai Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *Bioessays*. 2018; 40(6):e1800008. doi:10.1002/bies.201800008
16. Schuck S. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci*. 2020;133(17):jcs246322. Published 2020 Sep 9. doi:10.1242/jcs.246322
17. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):365-381. doi:10.1038/s41580-018-0001-6
18. Alfaro IE, Albornoz A, Molina A, et al. Chaperone Mediated Autophagy in the Crosstalk of Neurodegenerative Diseases and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;9:778. Published 2019 Jan 31. doi:10.3389/fendo.2018.00778
19. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):931-937. doi:10.1038/nrm2245
20. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:107-132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
21. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis*. 2014;19(4):555-566. doi:10.1007/s10495-014-0967-2
22. Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol*. 2009;186(6):773-782. doi:10.1083/jcb.200907014

23. Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* 2010;20(6):355-362. doi:10.1016/j.tcb.2010.03.002
24. Demirbağ-Sarikaya S, Çakir H, Gözüağık D, Akkoç Y. Crosstalk between autophagy and DNA repair systems. *Turk J Biol.* 2021;45(3):235-252. Published 2021 Jun 23.
25. Li M, Hou Y, Wang J, Chen X, Shao ZM, Yin XM. Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7327-7338. doi:10.1074/jbc.M110.199059
26. Bento CF, Puri C, Moreau K, Rubinsztein DC. The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 5):1059-1069. doi:10.1242/jcs.123075
27. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med.* 2006;27(5-6):495-502. doi:10.1016/j.mam.2006.08.005
28. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):664-673. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.014
29. Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy.* 2008;4(4):510-512. doi:10.4161/auto.5724
30. Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy.* 2013;9(9):1407-1417. doi:10.4161/auto.25455
31. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):4788-4793. doi:10.1073/pnas.1100844108
32. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010;40(2):280-293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
33. Tan VP, Miyamoto S. Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;95:31-41. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.005

34. Lim SM, Mohamad Hanif EA, Chin SF. Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. *Cell Biosci.* 2021;11(1):56. Published 2021 Mar 20. doi:10.1186/s13578-021-00570-z
35. Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):157-168. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.005
36. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 1998;273(7):3963-3966. doi:10.1074/jbc.273.7.3963
37. Jhanwar-Uniyal M, Wainwright JV, Mohan AL, et al. Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship. *Adv Biol Regul.* 2019;72:51-62. doi:10.1016/j.jbior.2019.03.003
38. Howell JJ, Manning BD. mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(3):94-102. doi:10.1016/j.tem.2010.12.003
39. Tato I, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL. Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J Biol Chem.* 2011;286(8):6128-6142. doi:10.1074/jbc.M110.166991
40. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152
41. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* 2012;32(1):2-11. doi:10.1128/MCB.06159-11
42. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism [published correction appears in J Biol Chem 1998 Aug 21;273(34):22160]. *J Biol Chem.* 1998;273(23):14484-14494. doi:10.1074/jbc.273.23.14484
43. Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. *Mol Cells.* 2013;35(6):463-473. doi:10.1007/s10059-013-0138-2

44. Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell*. 1996;7(1):25-42. doi:10.1091/mbc.7.1.25
45. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*. 2010;584(7):1287-1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
46. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem*. 2003;278(32):29655-29660. doi:10.1074/jbc.M212770200
47. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):251-262. Published 2012 Mar 22. doi:10.1038/nrm3311
48. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*. 2011;472(7342):230-233. doi:10.1038/nature09932
49. Woods A, Dickerson K, Heath R, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*. 2005;2(1):21-33. doi:10.1016/j.cmet.2005.06.005
50. Willows R, Sanders MJ, Xiao B, et al. Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells. *Biochem J*. 2017;474(17):3059-3073. Published 2017 Aug 22. doi:10.1042/BCJ20170458
51. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*. 2003;2(4):28. doi:10.1186/1475-4924-2-28
52. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460-473. doi:10.1089/ars.2013.5371
53. Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-590. doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2
54. Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*. 2007;25(2):193-205. doi:10.1016/j.molcel.2006.12.009

55. Pérez-Plasencia C, López-Urrutia E, García-Castillo V, Trujano-Camacho S, López-Camarillo C, Campos-Parra AD. Interplay Between Autophagy and Wnt/ β -Catenin Signaling in Cancer: Therapeutic Potential Through Drug Repositioning. *Front Oncol.* 2020;10:1037. Published 2020 Aug 18. doi:10.3389/fonc.2020.01037
56. Petherick KJ, Williams AC, Lane JD, et al. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J.* 2013;32(13):1903-1916. doi:10.1038/emboj.2013.123
57. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10):616-630. doi:10.1038/nrm3434
58. Zhang C, Zhang X, Xu R, et al. TGF- β 2 initiates autophagy via Smad and non-Smad pathway to promote glioma cells' invasion [retracted in: J Exp Clin Cancer Res. 2021 Dec 20;40(1):399]. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):162. Published 2017 Nov 16. doi:10.1186/s13046-017-0628-8
59. Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, et al. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009;69(23):8844-8852. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4401
60. Ding Y, Choi ME. Regulation of autophagy by TGF- β : emerging role in kidney fibrosis. *Semin Nephrol.* 2014;34(1):62-71. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.11.009
61. Singla M, Bhattacharyya S. Autophagy as a potential therapeutic target during epithelial to mesenchymal transition in renal cell carcinoma: An in vitro study. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:332-340. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.070
62. Tong H, Yin H, Hossain MA, et al. Starvation-induced autophagy promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells via TGF- β 1/Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J Cell Biochem.* 2019;120(4):5118-5127. doi:10.1002/jcb.27788
63. Li J, Yang B, Zhou Q, et al. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis.* 2013;34(6):1343-1351. doi:10.1093/carcin/bgt063
64. Yun CW, Lee SH. The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3466. Published 2018 Nov 5. doi:10.3390/ijms19113466

65. Dasari SK, Bialik S, Levin-Zaidman S, et al. Signalome-wide RNAi screen identifies GBA1 as a positive mediator of autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 2017;24(7):1288-1302. doi:10.1038/cdd.2017.80
66. Dasari SK, Schejter E, Bialik S, et al. Death by over-eating: The Gaucher disease associated gene GBA1, identified in a screen for mediators of autophagic cell death, is necessary for developmental cell death in Drosophila midgut. *Cell Cycle.* 2017;16(21):2003-2010. doi:10.1080/15384101.2017.1380134
67. Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 2010;13(7):805-811. doi:10.1038/nn.2575
68. Lorin S, Hamaï A, Mehrpour M, Codogno P. Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(5):361-379. doi:10.1016/j.semcancer.2013.06.007
69. Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1809-1820. doi:10.1172/JCI20039
70. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):15077-15082. doi:10.1073/pnas.2436255100
71. Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999;59(1):59-65. doi:10.1006/geno.1999.5851
72. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672-676. doi:10.1038/45257
73. Valente G, Morani F, Nicotra G, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:462658. doi:10.1155/2014/462658
74. Ding ZB, Shi YH, Zhou J, et al. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68(22):9167-9175. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1573
75. Xie X, White EP, Mehnert JM. Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS One.* 2013;8(1):e55096. doi:10.1371/journal.pone.0055096

76. Zheng HY, Zhang XY, Wang XF, Sun BC. Autophagy enhances the aggressiveness of human colorectal cancer cells and their ability to adapt to apoptotic stimulus. *Cancer Biol Med*. 2012;9(2):105-110. doi:10.3969/j.issn.2095-3941.2012.02.004
77. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pitiakoudis M, Gatter KC, Harris AL. Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. *Br J Cancer*. 2010;103(8):1209-1214. doi:10.1038/sj.bjc.6605904
78. Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, et al. Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS*. 2007;115(12):1344-1349. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.00858.x
79. Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity. *Exp Cell Res*. 2005;307(1):26-40. doi:10.1016/j.yexcr.2005.02.023
80. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability [published correction appears in *Genes Dev*. 2007 Jul 1;21(13):1701]. *Genes Dev*. 2007;21(11):1367-1381. doi:10.1101/gad.1545107
81. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 [published correction appears in *EMBO J*. 2019 May 15;38(10):]. *EMBO J*. 2007;26(7):1749-1760. doi:10.1038/sj.emboj.7601623
82. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [published correction appears in *Cell*. 2011 Apr 15;145(2):322]. *Cell*. 2009;137(6):1062-1075. doi:10.1016/j.cell.2009.03.048
83. Wang ZL, Deng Q, Chong T, Wang ZM. Autophagy suppresses the proliferation of renal carcinoma cell. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(2):343-350. doi:10.26355/eurrev_201801_14178
84. Izuishi K, Kato K, Ogura T, Kinoshita T, Esumi H. Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res*. 2000;60(21):6201-6207.

85. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(1):51-64. doi:10.1016/j.ccr.2006.06.001
86. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol*. 2008;33(3):461-468.
87. Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, et al. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci*. 2008;99(9):1813-1819. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00893.x
88. Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*. 2011;25(7):717-729. doi:10.1101/gad.2016111
89. Zinatizadeh MR, Momeni SA, Zarandi PK, et al. The Role and Function of Ras-association domain family in Cancer: A Review. *Genes Dis*. 2019;6(4):378-384. Published 2019 Jul 27. doi:10.1016/j.gendis.2019.07.008
90. Guo JY, Chen HY, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*. 2011;25(5):460-470. doi:10.1101/gad.2016311
91. Guo JY, Teng X, Laddha SV, et al. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev*. 2016;30(15):1704-1717. doi:10.1101/gad.283416.116
92. Huo Y, Cai H, Teplova I, et al. Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer. *Cancer Discov*. 2013;3(8):894-907. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0011
93. Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy*. 2015;11(6):867-880. doi:10.1080/15548627.2015.1034410
94. Sui X, Zhu J, Zhou J, et al. Epigenetic modifications as regulatory elements of autophagy in cancer. *Cancer Lett*. 2015;360(2):106-113. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.009
95. Jürgens, G. A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* 1985;316, 153–155. <https://doi.org/10.1038/316153a0>

96. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 1978;276(5688):565-570. doi:10.1038/276565a0
97. Simon J. Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(3):376-385. doi:10.1016/0955-0674(95)80093-x
98. Geng Z, Gao Z. Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8594. Published 2020 Nov 14. doi:10.3390/ijms21228594
99. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469(7330):343-349. doi:10.1038/nature09784
100. Piunti A, Shilatifard A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(5):326-345. doi:10.1038/s41580-021-00341-1
101. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(10):1147-1155. doi:10.1038/nsmb.2669
102. Piunti A, Shilatifard A. Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families. *Science*. 2016;352(6290):aad9780. doi:10.1126/science.aad9780
103. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. 2004;23(20):4061-4071. doi:10.1038/sj.emboj.7600402
104. Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell*. 2004;15(1):57-67. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.020
105. van Mierlo G, Veenstra GJC, Vermeulen M, Marks H. The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends Cell Biol*. 2019;29(8):660-671. doi:10.1016/j.tcb.2019.05.004
106. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*. 2004;431(7010):873-878. doi:10.1038/nature02985

107. Gao Z, Zhang J, Bonasio R, et al. PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*. 2012;45(3):344-356. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.002
108. Tavares L, Dimitrova E, Oxley D, et al. RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3 [published correction appears in *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1647-8]. *Cell*. 2012;148(4):664-678. doi:10.1016/j.cell.2011.12.029
109. Bhattacharya R, Mustafi SB, Street M, Dey A, Dwivedi SK. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology [published correction appears in *Genes Dis*. 2015 Dec 08;2(4):353]. *Genes Dis*. 2015;2(3):225-239. doi:10.1016/j.gendis.2015.04.001
110. Alkema MJ, Wiegant J, Raap AK, Berns A, van Lohuizen M. Characterization and chromosomal localization of the human proto-oncogene BMI-1. *Hum Mol Genet*. 1993;2(10):1597-1603. doi:10.1093/hmg/2.10.1597
111. Li Z, Cao R, Wang M, Myers MP, Zhang Y, Xu RM. Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*. 2006;281(29):20643-20649. doi:10.1074/jbc.M602461200
112. Cao L, Bombard J, Cintron K, Sheedy J, Weetall ML, Davis TW. BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *J Cell Biochem*. 2011;112(10):2729-2741. doi:10.1002/jcb.23234
113. Ginjala V, Nacerddine K, Kulkarni A, et al. BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol Cell Biol*. 2011;31(10):1972-1982. doi:10.1128/MCB.00981-10
114. Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(7):267-271.
115. Cohen KJ, Hanna JS, Prescott JE, Dang CV. Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5527-5535. doi:10.1128/MCB.16.10.5527
116. Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM. Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*. 1991;65(5):753-763. doi:10.1016/0092-8674(91)90383-a

117. Haupt Y, Bath ML, Harris AW, Adams JM. bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene*. 1993;8(11):3161-3164.
118. van Lohuizen M, Frasch M, Wientjens E, Berns A. Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2. *Nature*. 1991;353(6342):353-355. doi:10.1038/353353a0
119. Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev*. 1999;13(20):2678-2690. doi:10.1101/gad.13.20.2678
120. Dovey JS, Zacharek SJ, Kim CF, Lees JA. Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11857-11862. doi:10.1073/pnas.0803574105
121. Itahana K, Zou Y, Itahana Y, et al. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol*. 2003;23(1):389-401. doi:10.1128/MCB.23.1.389-401.2003
122. Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, et al. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2002;62(16):4736-4745.
123. Kim JH, Yoon SY, Kim CN, et al. The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett*. 2004;203(2):217-224. doi:10.1016/j.canlet.2003.07.009
124. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature*. 2004;428(6980):337-341. doi:10.1038/nature02385
125. Chen H, Zhou L, Wan G, Dou T, Tian J. BMI1 promotes the progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47(6):472-481. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.03.016
126. Kim JH, Yoon SY, Jeong SH, et al. Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer. *Breast*. 2004;13(5):383-388. doi:10.1016/j.breast.2004.02.010

127. Lukacs RU, Memarzadeh S, Wu H, Witte ON. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):682-693. doi:10.1016/j.stem.2010.11.013
128. Berezovska OP, Glinskii AB, Yang Z, Li XM, Hoffman RM, Glinsky GV. Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer. *Cell Cycle*. 2006;5(16):1886-1901. doi:10.4161/cc.5.16.3222
129. van Leenders GJ, Dukers D, Hessels D, et al. Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. *Eur Urol*. 2007;52(2):455-463. doi:10.1016/j.eururo.2006.11.020
130. Proctor E, Waghray M, Lee CJ, et al. Bmi1 enhances tumorigenicity and cancer stem cell function in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e55820. doi:10.1371/journal.pone.0055820
131. Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, et al. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer*. 2001;84(10):1372-1376. doi:10.1054/bjoc.2001.1791
132. Koren A, Rijavec M, Sodja E, et al. High BMI1 mRNA expression in peripheral whole blood is associated with favorable prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(15):25384-25394. doi:10.18632/oncotarget.15914
133. Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003;423(6937):255-260. doi:10.1038/nature01572
134. Beà S, Tort F, Pinyol M, et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res*. 2001;61(6):2409-2412.
135. Fan C, He L, Kapoor A, et al. PTEN inhibits BMI1 function independently of its phosphatase activity. *Mol Cancer*. 2009;8:98. Published 2009 Nov 10. doi:10.1186/1476-4598-8-98
136. Fan C, He L, Kapoor A, et al. Bmi1 promotes prostate tumorigenesis via inhibiting p16(INK4A) and p14(ARF) expression. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(11):642-648. doi:10.1016/j.bbdis.2008.08.009

137. Yan Q, Chen BJ, Hu S, et al. Emerging role of RNF2 in cancer: From bench to bedside. *J Cell Physiol.* 2021;236(8):5453-5465. doi:10.1002/jcp.30260
138. Vidal M. Role of polycomb proteins Ring1A and Ring1B in the epigenetic regulation of gene expression. *Int J Dev Biol.* 2009;53(2-3):355-370. doi:10.1387/ijdb.082690mv
139. Satijn DP, Otte AP. RING1 interacts with multiple Polycomb-group proteins and displays tumorigenic activity. *Mol Cell Biol.* 1999;19(1):57-68. doi:10.1128/MCB.19.1.57
140. Sanchez-Pulido L, Devos D, Sung ZR, Calonje M. RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics.* 2008;9:308. Published 2008 Jun 27. doi:10.1186/1471-2164-9-308
141. Bezsonova I, Walker JR, Bacik JP, Duan S, Dhe-Paganon S, Arrowsmith CH. Ring1B contains a ubiquitin-like docking module for interaction with Cbx proteins. *Biochemistry.* 2009;48(44):10542-10548. doi:10.1021/bi901131u
142. Chittock EC, Latwiel S, Miller TC, Müller CW. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(1):193-205. doi:10.1042/BST20160173
143. García E, Marcos-Gutiérrez C, del Mar Lorente M, Moreno JC, Vidal M. RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *EMBO J.* 1999;18(12):3404-3418. doi:10.1093/emboj/18.12.3404
144. Wang R, Taylor AB, Leal BZ, et al. Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. *Structure.* 2010;18(8):966-975. doi:10.1016/j.str.2010.04.013
145. Kloet SL, Makowski MM, Baymaz HI, et al. The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(7):682-690. doi:10.1038/nsmb.3248
146. Su WJ, Fang JS, Cheng F, Liu C, Zhou F, Zhang J. RNF2/Ring1b negatively regulates p53 expression in selective cancer cell types to promote tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(5):1720-1725. doi:10.1073/pnas.1211604110
147. Bosch A, Panoutsopoulou K, Corominas JM, et al. The Polycomb group protein RING1B is overexpressed in ductal breast carcinoma and is required to sustain FAK steady

state levels in breast cancer epithelial cells. *Oncotarget*. 2014;5(8):2065-2076. doi:10.18632/oncotarget.1779

148. Wei M, Jiao D, Han D, et al. Knockdown of RNF2 induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells through the upregulation of TXNIP. *Oncotarget*. 2017;8(3):5323-5338. doi:10.18632/oncotarget.14142

149. Chen J, Xu H, Zou X, et al. Snail recruits Ring1B to mediate transcriptional repression and cell migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2014;74(16):4353-4363. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0181

150. Qu C, Qu Y. Down-regulation of salt-inducible kinase 1 (SIK1) is mediated by RNF2 in hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*. 2017;8(2):3144-3155. doi:10.18632/oncotarget.13673

151. Rai K, Akdemir KC, Kwong LN, et al. Dual Roles of RNF2 in Melanoma Progression. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1314-1327. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0493

152. Zhang J, Sun Z, Han Y, et al. Rnf2 knockdown reduces cell viability and promotes cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3817-3822. doi:10.3892/ol.2017.5868

153. Li XD, Chen SL, Dong P, et al. Overexpression of RNF2 Is an Independent Predictor of Outcome in Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder Undergoing Radical Cystectomy. *Sci Rep*. 2016;6:20894. Published 2016 Feb 12. doi:10.1038/srep20894

154. Dey A, Mustafi SB, Saha S, Kumar Dhar Dwivedi S, Mukherjee P, Bhattacharya R. Inhibition of BMI1 induces autophagy-mediated necroptosis. *Autophagy*. 2016;12(4):659-670. doi:10.1080/15548627.2016.1147670

155. Griffith J, Andrade D, Mehta M, et al. Silencing BMI1 radiosensitizes human breast cancer cells by inducing DNA damage and autophagy. *Oncol Rep*. 2017;37(4):2382-2390. doi:10.3892/or.2017.5478

156. Wu J, Hu D, Zhang R. Depletion of Bmi-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2012;4(4):723-726. doi:10.3892/ol.2012.805

157. Mourgues L, Imbert V, Nebout M, et al. The BMI1 polycomb protein represses cyclin G2-induced autophagy to support proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 2015;29(10):1993-2002. doi:10.1038/leu.2015.112

158. Xia P, Wang S, Huang G, et al. RNF2 is recruited by WASH to ubiquitinate AMBRA1 leading to downregulation of autophagy. *Cell Res.* 2014;24(8):943-958. doi:10.1038/cr.2014.85
159. Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, et al. Understanding the Role of Autophagy in Cancer Formation and Progression Is a Real Opportunity to Treat and Cure Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(22):5622. Published 2021 Nov 10. doi:10.3390/cancers13225622
160. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:8023821. Published 2018 Jan 31. doi:10.1155/2018/8023821
161. Park SR, Yoo YJ, Ban YH, Yoon YJ. Biosynthesis of rapamycin and its regulation: past achievements and recent progress. *J Antibiot (Tokyo)*. 2010;63(8):434-441. doi:10.1038/ja.2010.71
162. Lin CJ, Tsao YN, Shu CW. Autophagy modulation as a potential targeted cancer therapy: From drug repurposing to new drug development. *Kaohsiung J Med Sci.* 2021;37(3):166-171. doi:10.1002/kjm2.12361
163. Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL, et al. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat Med.* 1997;3(4):421-428. doi:10.1038/nm0497-421
164. Douros J, Suffness M. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev.* 1981;8(1):63-87. doi:10.1016/s0305-7372(81)80006-0
165. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460(7253):392-395. doi:10.1038/nature08221
166. Calne RY, Collier DS, Lim S, et al. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet.* 1989;2(8656):227. doi:10.1016/s0140-6736(89)90417-0
167. Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey JA, Martelli AM. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(2):124-135. doi:10.1016/j.tips.2014.11.004

168. Zhou C, Zhong W, Zhou J, et al. Monitoring autophagic flux by an improved tandem fluorescent-tagged LC3 (mTagRFP-mWasabi-LC3) reveals that high-dose rapamycin impairs autophagic flux in cancer cells. *Autophagy*. 2012;8(8):1215-1226. doi:10.4161/auto.20284
169. Buzun K, Gornowicz A, Lesyk R, Bielawski K, Bielawska A. Autophagy Modulators in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5804. Published 2021 May 28. doi:10.3390/ijms22115804
170. Shiratori H, Kawai K, Hata K, et al. The combination of temsirolimus and chloroquine increases radiosensitivity in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2019;42(1):377-385. doi:10.3892/or.2019.7134
171. Inamura SO, Ito H, Taga M, et al. Low-dose Docetaxel Enhanced the Anticancer Effect of Temsirolimus by Overcoming Autophagy in Prostate Cancer Cells. *Anticancer Res*. 2019;39(10):5417-5425. doi:10.21873/anticancer.13735
172. Kondo S, Hirakawa H, Ikegami T, et al. Raptor and rictor expression in patients with human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2021;21(1):87. Published 2021 Jan 22. doi:10.1186/s12885-021-07794-9
173. Trivedi ND, Armstrong S, Wang H, et al. A phase I trial of the mTOR inhibitor temsirolimus in combination with capecitabine in patients with advanced malignancies. *Cancer Med*. 2021;10(6):1944-1954. doi:10.1002/cam4.3672
174. Feldman DR, Ged Y, Lee CH, et al. Everolimus plus bevacizumab is an effective first-line treatment for patients with advanced papillary variant renal cell carcinoma: Final results from a phase II trial. *Cancer*. 2020;126(24):5247-5255. doi:10.1002/cnccr.33148
175. El Guerrab A, Bamdad M, Bignon YJ, Penault-Llorca F, Aubel C. Co-targeting EGFR and mTOR with gefitinib and everolimus in triple-negative breast cancer cells. *Sci Rep*. 2020;10(1):6367. Published 2020 Apr 14. doi:10.1038/s41598-020-63310-2
176. Zhu M, Molina JR, Dy GK, et al. A phase I study of the VEGFR kinase inhibitor vatalanib in combination with the mTOR inhibitor, everolimus, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2020;38(6):1755-1762. doi:10.1007/s10637-020-00936-z

177. Werner EA, Bell J. The preparation of methylguanidine, and of β β -dimethylguanidine by the interaction of dicyanodiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J. Chem. Soc. Trans.* 1922;121:1790-1794. Doi:
178. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017;60(9):1566-1576. doi:10.1007/s00125-017-4318-z
179. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(3):143-156. doi:10.1038/nrendo.2013.256
180. Lu G, Wu Z, Shang J, Xie Z, Chen C, Zhang C. The effects of metformin on autophagy. *Biomed Pharmacother*. 2021;137:111286. doi:10.1016/j.biopha.2021.111286
181. Tomic T, Botton T, Cerezo M, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis*. 2011;2(9):e199. Published 2011 Sep 1. doi:10.1038/cddis.2011.86
182. Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, et al. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int*. 2014;14:53. Published 2014 Jun 16. doi:10.1186/1475-2867-14-53
183. Diamanti-Kandarakis E, Economou F, Palimeri S, Christakou C. Metformin in polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1205:192-198. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05679.x
184. Patel R, Shah G. Effect of metformin on clinical, metabolic and endocrine outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin*. 2017;33(9):1545-1557. doi:10.1080/03007995.2017.1279597
185. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(9):867-885. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0424
186. Piskovatska V, Stefanyshyn N, Storey KB, Vaiserman AM, Lushchak O. Metformin as a geroprotector: experimental and clinical evidence. *Biogerontology*. 2019;20(1):33-48. doi:10.1007/s10522-018-9773-5

187. Bannister CA, Holden SE, Jenkins-Jones S, et al. Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(11):1165-1173. doi:10.1111/dom.12354
188. Chmurska A, Matczak K, Marczak A. Two Faces of Autophagy in the Struggle against Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2981. Published 2021 Mar 15. doi:10.3390/ijms22062981
189. Pérez-Hernández M, Arias A, Martínez-García D, Pérez-Tomás R, Quesada R, Soto-Cerrato V. Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers (Basel).* 2019;11(10):1599. Published 2019 Oct 19. doi:10.3390/cancers11101599
190. Turek K, Jarocki M, Kulbacka J, Saczko J. Dualistic role of autophagy in cancer progression. *Adv Clin Exp Med.* 2021;30(12):1303-1314. doi:10.17219/acem/141191
191. Tang F, Hu P, Yang Z, et al. SBI0206965, a novel inhibitor of Ulk1, suppresses non-small cell lung cancer cell growth by modulating both autophagy and apoptosis pathways. *Oncol Rep.* 2017;37(6):3449-3458. doi:10.3892/or.2017.5635
192. Egan DF, Chun MG, Vamos M, et al. Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol Cell.* 2015;59(2):285-297. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.031
193. Zheng Y, Liu L, Wang Y, et al. Glioblastoma stem cell (GSC)-derived PD-L1-containing exosomes activates AMPK/ULK1 pathway mediated autophagy to increase temozolomide-resistance in glioblastoma. *Cell Biosci.* 2021;11(1):63. Published 2021 Mar 31. doi:10.1186/s13578-021-00575-8
194. Lu J, Zhu L, Zheng LP, et al. Overexpression of ULK1 Represents a Potential Diagnostic Marker for Clear Cell Renal Carcinoma and the Antitumor Effects of SBI-0206965. *EBioMedicine.* 2018;34:85-93. doi:10.1016/j.ebiom.2018.07.034
195. Dyczynski M, Yu Y, Otrocka M, et al. Targeting autophagy by small molecule inhibitors of vacuolar protein sorting 34 (Vps34) improves the sensitivity of breast cancer cells to Sunitinib. *Cancer Lett.* 2018;435:32-43. doi:10.1016/j.canlet.2018.07.028

196. Pasquier B. SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. *Autophagy*. 2015;11(4):725-726. doi:10.1080/15548627.2015.1033601
197. Janji B, Hasmim M, Parpal S, De Milito A, Berchem G, Noman MZ. Lighting up the fire in cold tumors to improve cancer immunotherapy by blocking the activity of the autophagy-related protein PIK3C3/VPS34. *Autophagy*. 2020;16(11):2110-2111. doi:10.1080/15548627.2020.1815439
198. Akin D, Wang SK, Habibzadegah-Tari P, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors. *Autophagy*. 2014;10(11):2021-2035. doi:10.4161/auto.32229
199. Kurdi A, Cleenewerck M, Vangestel C, et al. ATG4B inhibitors with a benzotropolone core structure block autophagy and augment efficiency of chemotherapy in mice. *Biochem Pharmacol*. 2017;138:150-162. doi:10.1016/j.bcp.2017.06.119
200. Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol*. 2009;625(1-3):220-233. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.063
201. Pellegrini P, Strambi A, Zipoli C, et al. Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: implications for cancer therapies. *Autophagy*. 2014;10(4):562-571. doi:10.4161/auto.27901
202. Mahalingam D, Mita M, Sarantopoulos J, et al. Combined autophagy and HDAC inhibition: a phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors. *Autophagy*. 2014;10(8):1403-1414. doi:10.4161/auto.29231
203. Rosenfeld MR, Ye X, Supko JG, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy*. 2014;10(8):1359-1368. doi:10.4161/auto.28984
204. McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):8253-8258. doi:10.1073/pnas.1118193109

205. DeVorkin L, Hattersley M, Kim P, et al. Autophagy Inhibition Enhances Sunitinib Efficacy in Clear Cell Ovarian Carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2017;15(3):250-258. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0132
206. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
207. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
208. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275
209. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440-446. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947
210. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4
211. Fukuda T, Wada-Hiraike O. The Two-Faced Role of Autophagy in Endometrial Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:839416. Published 2022 Mar 31. doi:10.3389/fcell.2022.839416
212. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
213. Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol Oncol.* 2009;3(4):366-375. doi:10.1016/j.molonc.2009.05.007
214. Shi TT, Yu XX, Yan LJ, Xiao HT. Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(2):287-294. doi:10.1007/s00280-016-3197-1
215. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007;21(13):1621-1635. doi:10.1101/gad.1565707

216. Talebian S, Daghighi H, Yousefi B, et al. The role of epigenetics and non-coding RNAs in autophagy: A new perspective for thorough understanding. *Mech Ageing Dev.* 2020;190:111309. doi:10.1016/j.mad.2020.111309
217. Yao Y, Hu H, Yang Y, et al. Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) is essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Genes (Basel).* 2016;7(10):83. Published 2016 Oct 3. doi:10.3390/genes7100083
218. Xu H, Zhang L, Qian X, et al. GSK343 induces autophagy and downregulates the AKT/mTOR signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Exp Ther Med.* 2019;18(4):2608-2616. doi:10.3892/etm.2019.7845
219. Kim TW, Lee HG. Apigenin Induces Autophagy and Cell Death by Targeting EZH2 under Hypoxia Conditions in Gastric Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13455. Published 2021 Dec 15. doi:10.3390/ijms222413455
220. Zhang X, Ma X, Wang Q, Kong Z. EZH2 targeting to improve the sensitivity of acquired radio-resistance bladder cancer cells. *Transl Oncol.* 2022;16:101316. doi:10.1016/j.tranon.2021.101316
221. Fimia GM, Di Bartolomeo S, Piacentini M, Cecconi F. Unleashing the Ambra1-Becn1 complex from dynein chains: Ulk1 sets Ambra1 free to induce autophagy. *Autophagy.* 2011;7(1):115-117. doi:10.4161/auto.7.1.14071
222. Nazio F, Po A, Abballe L, et al. Targeting cancer stem cells in medulloblastoma by inhibiting AMBRA1 dual function in autophagy and STAT3 signalling. *Acta Neuropathol.* 2021;142(3):537-564. doi:10.1007/s00401-021-02347-7
223. Román-Trufero M, Méndez-Gómez HR, Pérez C, et al. Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B. *Stem Cells.* 2009;27(7):1559-1570. doi:10.1002/stem.82
224. Posfai E, Kunzmann R, Brochard V, et al. Polycomb function during oogenesis is required for mouse embryonic development. *Genes Dev.* 2012;26(9):920-932. doi:10.1101/gad.188094.112
225. de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, et al. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell.* 2004;7(5):663-676. doi:10.1016/j.devcel.2004.10.005

226. Bravo M, Nicolini F, Starowicz K, et al. Polycomb RING1A- and RING1B-dependent histone H2A monoubiquitylation at pericentromeric regions promotes S-phase progression. *J Cell Sci.* 2015;128(19):3660-3671. doi:10.1242/jcs.173021
227. del Mar Lorente M, Marcos-Gutiérrez C, Pérez C, et al. Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice. *Development.* 2000;127(23):5093-5100. doi:10.1242/dev.127.23.5093
228. Voncken JW, Roelen BA, Roefs M, et al. Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2468-2473. doi:10.1073/pnas.0434312100
229. Ismail IH, McDonald D, Strickfaden H, Xu Z, Hendzel MJ. A small molecule inhibitor of polycomb repressive complex 1 inhibits ubiquitin signaling at DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* 2013;288(37):26944-26954. doi:10.1074/jbc.M113.461699
230. Liu WJ, Ye L, Huang WF, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016;21:29. Published 2016 Dec 13. doi:10.1186/s11658-016-0031-z
231. Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 2007;131(6):1149-1163. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035
232. Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, Wong PK, Chapman E, Zhang DD. p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B):199-204. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014
233. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 2009;452:181-197. doi:10.1016/S0076-6879(08)03612-4
234. Mayr C, Wagner A, Loeffelberger M, et al. The BMI1 inhibitor PTC-209 is a potential compound to halt cellular growth in biliary tract cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(1):745-758. doi:10.18632/oncotarget.6378
235. Zhang Y, He N, Zhou X, et al. Betulinic acid induces autophagy-dependent apoptosis via Bmi-1/ROS/AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells. *Aging (Albany NY).* 2021;13(17):21251-21267. doi:10.18632/aging.203441

236. Wang F, Wu H, Fan M, et al. Sodium butyrate inhibits migration and induces AMPK-mTOR pathway-dependent autophagy and ROS-mediated apoptosis via the miR-139-5p/Bmi-1 axis in human bladder cancer cells. *FASEB J.* 2020;34(3):4266-4282. doi:10.1096/fj.201902626R
237. Moruno F, Pérez-Jiménez E, Knecht E. Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells.* 2012;1(3):372-395. Published 2012 Jul 27. doi:10.3390/cells1030372
238. Nakai N, Kitai S, Iida N, Inoue S, Higashida K. Autophagy under glucose starvation enhances protein translation initiation in response to re-addition of glucose in C2C12 myotubes. *FEBS Open Bio.* 2020;10(10):2149-2156. doi:10.1002/2211-5463.12970
239. Bhattacharya B, Low SH, Soh C, et al. Increased drug resistance is associated with reduced glucose levels and an enhanced glycolysis phenotype. *Br J Pharmacol.* 2014;171(13):3255-3267. doi:10.1111/bph.12668
240. Hsin IL, Shen HP, Chang HY, Ko JL, Wang PH. Suppression of PI3K/Akt/mTOR/c-Myc/mtp53 Positive Feedback Loop Induces Cell Cycle Arrest by Dual PI3K/mTOR Inhibitor PQR309 in Endometrial Cancer Cell Lines. *Cells.* 2021;10(11):2916. Published 2021 Oct 27. doi:10.3390/cells10112916
241. Krześlak A. Kinaza Akt: kluczowy regulator metabolizmu i progresji nowotworów [Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2010;64:490-503. Published 2010 Oct 19.
242. Warfel NA, Newton AC. Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP): a new player in cell signaling. *J Biol Chem.* 2012;287(6):3610-3616. doi:10.1074/jbc.R111.318675
243. Wan X, Li J, Xie X, Lu W. PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(4):808-812. doi:10.1111/j.1525-1438.2007.00890.x
244. Zaczek A, Szustka A, Krześlak A. Glucose and Cell Context-Dependent Impact of BMI-1 Inhibitor PTC-209 on AKT Pathway in Endometrial Cancer Cells. *Cancers (Basel).* 2022;14(23):5947. Published 2022 Dec 1. doi:10.3390/cancers14235947

245. Alchanati I, Teicher C, Cohen G, et al. The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2alpha cleavage complex - a potentially new drug target. *PLoS One*. 2009;4(12):e8104. Published 2009 Dec 1. doi:10.1371/journal.pone.0008104
246. Desai D, Khanna A, Pethe P. Inhibition of RING1B alters lineage specificity in human embryonic stem cells. *Cell Biol Int*. 2020;44(6):1299-1311. doi:10.1002/cbin.11325
247. Elango R, Vishnubalaji R, Manikandan M, et al. Concurrent targeting of BMI1 and CDK4/6 abrogates tumor growth in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2019;9(1):13696. Published 2019 Sep 23. doi:10.1038/s41598-019-50140-0
248. Li B, Zhou P, Xu K, et al. Metformin induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy through ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma [published correction appears in *Int J Biol Sci*. 2022 Jul 8;18(11):4468]. *Int J Biol Sci*. 2020;16(1):74-84. Published 2020 Jan 1. doi:10.7150/ijbs.33787
249. Wang Y, Xu W, Yan Z, et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):63. Published 2018 Mar 20. doi:10.1186/s13046-018-0731-5
250. Chen YH, Huang YC, Yang SF, et al. Pitavastatin and metformin synergistically activate apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells. *Environ Toxicol*. 2021;36(8):1491-1503. doi:10.1002/tox.23146
251. Liu Y, Wang Y, Yao D, et al. Diane-35 and Metformin Induce Autophagy and Apoptosis in Polycystic Ovary Syndrome Women with Early-Stage Endometrial Carcinoma. *Genes (Basel)*. 2022;13(1):131. Published 2022 Jan 12. doi:10.3390/genes13010131
252. Gu CJ, Cheng J, Zhang B, et al. Protopanaxadiol and metformin synergistically inhibit estrogen-mediated proliferation and anti-autophagy effects in endometrial cancer cells. *Am J Transl Res*. 2017;9(9):4071-4082. Published 2017 Sep 15.
253. Zheng Y, Jiang Y. mTOR Inhibitors at a Glance. *Mol Cell Pharmacol*. 2015;7(2):15-20.
254. Park CW, Hong SM, Kim ES, et al. BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK. *Autophagy*. 2013;9(3):345-360. doi:10.4161/auto.23072

255. Wang X, Shen C, Liu Z, et al. Nitazoxanide, an antiprotozoal drug, inhibits late-stage autophagy and promotes ING1-induced cell cycle arrest in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2018;9(10):1032. Published 2018 Oct 9. doi:10.1038/s41419-018-1058-z
256. Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, et al. Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2560-2566. doi:10.3892/ol.2016.4978
257. He Y, Shi Y, Yang Y, et al. Chrysin induces autophagy through the inactivation of the ROS-mediated Akt/mTOR signaling pathway in endometrial cancer. *Int J Mol Med.* 2021;48(3):172. doi:10.3892/ijmm.2021.5005
258. Cook KL, Wärrri A, Soto-Pantoja DR, et al. Hydroxychloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer [published correction appears in Clin Cancer Res. 2016 Jun 1;22(11):2825]. *Clin Cancer Res.* 2014;20(12):3222-3232. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3227
259. Vijayaraghavan S, Karakas C, Doostan I, et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers. *Nat Commun.* 2017;8:15916. Published 2017 Jun 27. doi:10.1038/ncomms15916
260. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(9):528-542. doi:10.1038/nrc.2017.53
261. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003;22(53):8543-8567. doi:10.1038/sj.onc.1207107
262. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell.* 1998;94(6):695-698. doi:10.1016/s0092-8674(00)81728-6
263. Smolewski P, Darzynkiewicz Z. Współczesne metody badania apoptozy. *Acta Haematologica Polonica*, vol. 34, no. 1, 2003, pp. 35-47
264. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.* 2010;17(3):381-397. doi:10.1038/cdd.2009.195
265. Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):263-268. doi:10.1016/j.ceb.2009.12.003

266. Lin Y, Devin A, Rodriguez Y, Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13(19):2514-2526. doi:10.1101/gad.13.19.2514
267. Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012;148(1-2):213-227. doi:10.1016/j.cell.2011.11.031

14. Dorobek naukowy

Publikacje oryginalne i przeglądowe

1. Zaczek A, **Szustka A**, Krześlak A. Glucose and cell context-dependent impact of BMI-1 inhibitor PTC-209 on AKT pathway in endometrial cancer cells. *Cancers (Basel)*. 2022;14(23):5947

IF = 6,575 ; 5-letni IF = 6,886; punkty MNiSW = 140

2. Kubczak M, **Szustka A**, Rogalińska M. Molecular targets of natural compounds with anticancer properties. *Int J Mol Sci*. 2022, 22(24), 13659

IF = 6,208 ; 5-letni IF = 6,628; punkty MNiSW = 140

3. Lis B, Rywaniak J, Jędrejek D, **Szustka A**, Stochmal A, Olas B. Antiplatelet activity of phytocompounds in various dandelion organs in human whole blood model in vitro. *J Funct Foods*. 2021;80:104438-104445

IF = 5,223; 5-letni IF = 4,432; punkty MNiSW = 100

4. Skalski B, Rywaniak J, **Szustka A**, Żuchowski J, Stochmal A, Olas B. Anti-platelet properties of phenolic and nonpolar fractions isolated from various organs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson in whole blood. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3282-3293

IF = 6,208; 5-letni IF = 6,628; punkty MNiSW = 140

5. Kubczak M, **Szustka A**, Błoński JZ, Gucky T, Misiewicz M, Krystof V, Robak P, Rogalińska M. Dose and drug changes in chronic lymphocytic leukemia cell response *in vitro*: A comparison of standard therapy regimens with two novel cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Med Rep*. 2019;19(5):3593-3603

IF = 3,432; 5-letni IF = 2,748; punkty MNiSW = 70

6. **Szustka A**, Rogalińska M. Potential application for stem cells in regenerative medicine and transplantology. *Postępy Biochemii*, 2017;63(2):143-150

IF = 0; 5-letni IF = 0; punkty MNiSW = 8

IF = 27,646 ; sumaryczny 5-letni IF = 27,322; sumaryczne punkty MNiSW = 598

Doniesienia konferencyjne

1. **Szustka A**, Krześlak A. Impact of BMI and RING1 silencing/inhibition on autophagy process in endometrial cancer cells. The 46th FEBS Congress, 9-14 July 2022, Lizbona

2. Zaczek A, **Szustka A**, Lasota J, Litwinowicz M, Krześlak A. Impact of BMI-1 on AKT pathway regulation and migration/invasion potential of endometrial cancer cells. The 44thFEBS Congress, 6-11 July 2019, Kraków
3. Zaczek A, **Szustka A**, Krześlak A. Rola fosfataz PFLPP w procesie nowotworzenia. III Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Przyrodniczych, 25-28 czerwca 2019, Gdańsk
4. **Szustka A**, Zaczek A, Krześlak A. Rola kompleksu PRC1 w mechanizmie autofagii. III Konferencja Naukowa Doktorantów Nauk Przyrodniczych, 25-28 czerwca 2019, Gdańsk
5. **Szustka A**, Zaczek A, Krześlak A. Analiza zależności pomiędzy ekspresją BMI1 a ekspresją genów związanych z procesem autofagii w raku endometrium. V Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 30-31 maja 2019, Łódź
6. Lasota J, Zaczek A, **Szustka A**. Wpływ PTC-209, inhibitora ekspresji białka Polycomb BMI-1, na aktywność kinazy AKT oraz ekspresję genów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym. V Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP. 1-2 grudnia 2018, Lublin
7. Kubczak M, **Szustka A**, Gucký T, Krystof V, Błoński J, Robak T, Rogalińska M. The comparison of roscovitine derivatives activity with novel kinase and Bcl-2 inhibitors on CLL cells. 10th Anniversary International Conference of Contemporary Oncology. 22-24 March 2018, Poznań
8. **Szustka A**, Kubczak M, Błoński J, Robak T, Rogalińska M. Anticancer activity of natural compounds in CLL cells. 10th Anniversary International Conference of Contemporary Oncology. 22-24 March 2018, Poznań
9. Kubczak M, **Szustka A**. Czy sygnały wysyłane przez komórki apoptotyczne mogą działać onkogennie? X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL. 17-18 March 2018, Lublin
10. **Szustka A**, Kubczak M, Krześlak A. Apoptoza i autofagia - partnerzy na śmierć i życie. X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL. 17-18 March 2018, Lublin
11. Juszczak M, **Szustka A**, Rogalińska M. Wpływ kurkuminy na metylację DNA. X Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGEL. 17-18 March 2018, Lublin
12. Kubczak M, **Szustka A**, Gucký T, Krystof V, Błoński J, Robak T, Rogalińska M. Nowe pochodne roscowityny jako induktory apoptozy w komórkach przewlekłej białaczki limfocytowej. III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu - BioOpen, 11-12 May 2017, Łódź

13. **Szustka A**, Kubczak M, Błoński J, Góralski P, Robak T, Rogalińska M. Analiza potencjału antynowotworowego związków pochodzenia naturalnego. III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu - BioOpen. 11-12 May 2017, Łódź
14. Kubczak M, **Szustka A**, Gucký T, Krystof V, Błoński J, Robak T, Rogalińska M. Novel roscovitine derivatives as promising drugs for CLL treatment. 9th International Conference of Contemporary Oncology. 22-24 March 2017, Poznań
15. **Szustka A**, Kubczak M, Błoński J, Góralski P, Robak T, Rogalińska M. Natural compounds as a potential anticancer agents for CLL. 9th International Conference of Contemporary Oncology. 22-24 March 2017, Poznań
16. Kubczak M, **Szustka A**, Rogalińska M. Mcl-1 w patogenezie i terapii przewlekłej białaczki limfocytowej. IX Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL. 18-19 March 2017, Lublin
17. **Szustka A**, Kubczak M, Rogalińska M. Zastosowanie związków naturalnych jako induktorów apoptozy przewlekłej białaczki limfocytowej. IX Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL. 18-19 March 2017, Lublin
18. Rogalińska M, Kubczak M, **Szustka A**, Cygankiewicz A, Barciszewski J, Błoński JZ, Góralski P, Piekarski H, Robak T, Kiliańska ZM. Anticancer drugs could imply on CLL cell signaling as well as on apoptosis induction. 2nd Congress BIO 2016. 13-16 September 2016, Wrocław
19. Rogalińska M, Błoński J, Góralski P, Robak P, Kubczak M, **Szustka A**, Rogalska A, Koceva-Chyła A, Barciszewski J, Piekarski H, Robak T, Kiliańska ZM. Personalized versus directed therapy for CLL. 8th International Conference of Contemporary Oncology. 16-18 March 2016, Poznań

Projekty badawcze

1. Wpływ zahamowania aktywności kompleksu Polycomb PRC1 na proces autofagii w komórkach raka endometrium i piersi (2018/31/N/NZ5/01046) – projekt finansowany z Narodowego Centrum Nauki, Preludium 16 (lipiec 2019 – lipiec 2023); 140 000,00 PLN; **kierownik projektu – mgr Szustka A.**, opiekun projektu – Krześlak A.
2. Wpływ zahamowania ekspresji białka BMI-1 na ekspresję genów związanych z procesem autofagii oraz proliferację komórek raka endometrium (5811/E-345/M/2019) – projekt finansowany z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznany przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (czerwiec 2018 – grudzień 2018); 5 000,00 PLN, **kierownik projektu – mgr Szustka A.**

3. Wpływ zahamowania ekspresji genu *BMI1* na ekspresję genów związanych z procesem autofagii w komórkach raka endometrium (5811/E-345/M/2018) – projekt finansowany z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznany przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (czerwiec 2018 – grudzień 2018); 6 842,00 PLN, **kierownik projektu – mgr Szustka A.**