



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Agnieszka Zaczek

Udział białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w raku endometrium

Role of BMI-1 protein in regulation of AKT pathway
in endometrial cancer

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Cytobiochemii
Instytutu Biochemii

pod kierunkiem
dr. hab. Anny Krześlak

Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi niniejszej rozprawy doktorskiej
dr hab. Annie Krześlak, prof. UŁ
za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki,
poświęcony czas, wyrozumiałość i cierpliwość.

Dziękuję Pracownikom i Doktorantom Katedry Cytobiochemii
Uniwersytetu Łódzkiego za okazaną pomoc.

Dziękuję mgr Aleksandrze Szustce, mgr Małgorzacie Kubczak
za pomoc, życzliwość i przyjazną atmosferę pracy.

oraz

Moim Najbliższym za wiarę we mnie, wsparcie,
wyrozumiałość, pomoc i uśmiech w trudnych chwilach.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i symboli	6
Wstęp.....	13
1. Charakterystyka białka BMI-1	14
1.1. Występowanie i struktura BMI-1	14
1.2. Regulacja ekspresji i aktywności BMI-1.....	15
1.2.1 Regulacja transkrypcji <i>BMI1</i>	15
1.2.2. Regulacja potranskrypcyjna <i>BMI1</i>	17
1.2.3. Regulacja potranslacyjna BMI-1	20
2. Rola białka BMI-1 w procesach komórkowych.....	21
2.1. Białko BMI-1 jako regulator cyklu komórkowego	21
2.2. Rola BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT.....	22
2.3. Udział BMI-1 w procesie apoptozy i autofagii komórek	24
2.4. Wpływ BMI-1 na starzenie się komórek.....	27
Rozdział 3. Udział białka BMI-1 w procesie nowotworzenia.....	28
3.1. Rola BMI-1 w prawidłowych i nowotworowych komórkach macierzystych.....	28
3.2. Zmiany ekspresji BMI-1 w komórkach nowotworowych.....	31
3.3. BMI-1, potencjalny cel terapii antynowotworowych.....	33
4. Cel badań.....	37
5. Materiał	38
5.1. Materiał kliniczny	38
5.2. Linie komórkowe raka błony śluzowej raka trzonu macicy.....	39
6. Metody	41
6.1. Hodowla komórek	41
6.2. Zmniejszenie ekspresji BMI-1 metodą interferencji RNA oraz przez zastosowanie PTC-209	41
6.3. Traktowanie komórek	42
6.4. Izolowanie RNA.....	42
6.5. Spektrofotometryczna analiza czystości RNA	43
6.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	43
6.7. Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real Time PCR).....	44
6.8. Otrzymywanie lizatu komórkowego	46
6.9. Western blotting	46
6.9.1. Elektroforeza	46

6.9.2. Transfer białek na membranę Immobilonu-P	46
6.9.3. Immunodetekcja białek	47
6.10. Analiza ilościowa białka metodą Lowry'ego	49
6.11. Testy na migrację i inwazję.....	49
6.11.1 Test „wound-healing”	50
6.11.2. Test „Transwell-assay” i ocena potencjału inwazyjnego komórek przy pomocy Matrigel® Basement Membrane Matrix (Corning).....	50
6.13. Ocena żywotności i proliferacji komórek testem MTT.....	51
6.14. Immunoprecypitacja chromatyny.....	51
6.14.1. Ilościowa analiza DNA otrzymanego po immunoprecypitacji chromatyny z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym.....	53
6.15. Analiza statystyczna.....	54
7. Wyniki.....	55
7.1. Wpływ wyciszenia ekspresji genu <i>BMI1</i> w komórkach raka endometrium HEC-1A oraz Ishikawa na fosforylację kinazy AKT i ekspresję genów fosfataz zaangażowanych w jej regulację.....	55
7.2. Wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 poprzez zastosowanie inhibitora PTC-209 na poziom fosforylacji kinazy AKT oraz ekspresję genów fosfataz w komórkach raka endometrium.....	57
7.3. Określenie lokalizacji białka BMI-1 w regionach promotorowych genów <i>PHLPP1</i> , <i>PHLPP2</i> , <i>PTEN</i> w komórkach raka endometrium.....	60
7.4. Wpływ stężenia glukozy na zależną od BMI-1 fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję genów fosfataz w komórkach raka endometrium.....	61
7.5. Wpływ stymulacji insuliną na ekspresję BMI-1 w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa w warunkach hipo- i hiperglikemii	64
7.6. Wpływ stymulacji insuliną na zależną od BMI-1 regulację ekspresji genów fosfataz oraz fosforylację kinazy AKT w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa.....	66
7.7. Wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 w warunkach hipo- i hiperglikemii na żywotność i proliferację komórek raka endometrium	74
7.8. Wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek raka endometrium oraz ekspresję genów zaangażowanych w przejście epithelialno-mezenchymalne. 76	
7.9. Analiza porównawcza ekspresji białek BMI-1 i PTEN oraz poziomu fosforylowanej na Ser473 kinazy AKT w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy 80	
7.10. Analiza porównawcza ekspresji genów <i>PTEN</i> , <i>PHLPP1</i> i <i>PHLPP2</i> w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy	83
7.11. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją BMI-1, PTEN, PHLPP1, PHLPP2 oraz fosforylacją kinazy AKT w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy	85
8. Dyskusja.....	87
9. Wnioski	96
10. Streszczenie.....	97

11.	Summary	99
12.	Bibliografia	101

Wykaz stosowanych skrótów i symboli

3pK	(ang. <i>Mitogen-activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 3</i>) serynowo-treoninowa kinaza MAPKAPK3
A375	linia komórkowa czerniaka
AKT	(ang. <i>protein kinase B, PKB</i>) białkowa kinaza serynowo-treoninowa
AKT1	(ang. <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>) gen kodujący białko o aktywności kinazy serynowo-treoninowej
Arf/p53	(ang. <i>ADP-ribosylation factor/protein 53</i>) szlak zaangażowany w regulację cyklu komórkowego
ATCC	(ang. <i>American Type Culture Collection</i>) amerykańska organizacja non-profit, która zbiera, przechowuje i dystrybuje mikroorganizmy i linie komórkowe oraz biopreparaty do badań naukowych
ATF3	(ang. <i>cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3</i>) gen kodujący czynnik transkrypcyjny
Atg	(ang. <i>autophagy-related protein</i>) białko zaangażowane w proces autofagii
ATP	(ang. <i>adenosine triphosphate</i>) adenozyno-5'-trifosforan
βTrCP	(ang. <i>β-transducing repeat-containing protein</i>) ligaza ubikwitynowa
Bax	(ang. <i>Bcl-2-like protein 4</i>) białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2
Bcl-2	(ang. <i>B-cell lymphoma 2</i>) białko antyapoptotyczne
Bim	(ang. <i>Bcl-2-like protein 11</i>) białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-only (ang. <i>Bcl-2 modifying factor</i>)
BMI-1	(ang. <i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>) białko kompleksu PRC1
BCSC	(ang. <i>breast cancer stem cells</i>) komórki macierzyste raka piersi
C57BL/6	mysi model badawczy
c-Fos	protoonkogen, czynnik transkrypcyjny
c-Myc	(ang. <i>myelocytomatosis</i>) protoonkogen, czynnik transkrypcyjny
CAM	(ang. <i>chorioal Latonic membrane</i>) błony kosmórkowo-owodniowa kurzych zarodków
CBX4	(ang. <i>chromobox</i>) białko Polycomb posiadające chromodomenę
CD	(ang. <i>cluster of differentiation</i>) glikoproteiny powierzchniowe
CDH1	gen kodujący E-kadherynę
CDK 2,4,6	(ang. <i>cyclin-dependent kinase</i>) kinazy zależne od cyklin 2,4,6
CG	(ang. <i>chorionic gonadotropin</i>) gonadotropina kosmówkowa

CHIP	(ang. <i>chromatin immunoprecipitation</i>) immunoprecypitacja chromatyny
CHK2	(ang. <i>checkpoint kinase 2</i>) kinaza serynowo-treoninowa
CP20	linia komórkowa raka jajnika
CRH	(ang. <i>corticotropin-releasing hormone</i>), kortykoliberyna, hormon uwalniający kortykotropinę
CSC	(ang. <i>cancer stem cells</i>) nowotworowe komórki macierzyste
DPBS	(ang. <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>) buforowana fosforanem sól fizjologiczna Dulbecco
DU145	linia komórkowa raka prostaty
E2F-1	(ang. <i>E2F transcription factor 1</i>) czynnik transkrypcyjny
ECA109	linia komórkowa raka przelyku
ECACC	(ang. <i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>) Europejska Kolekcja Hodowli Komórkowych, dysponująca materiałem pochodzącym z różnych narządów i reprezentującym odmienne właściwości
EMT	(ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>) przejście epitelialno-mezenchymalne
Ets-1	(ang. <i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)</i>) czynnik transkrypcyjny
ER	(ang. <i>estrogen receptor</i>) receptor estrogenowy
FBS	(ang. <i>fetal bovine serum</i>) płodowa surowica bydłęca
FIGO	(ang. <i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>) Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa
FOXM1	(ang. <i>Forkhead Box M1</i>) czynnik transkrypcyjny
FOXO1	(ang. <i>Forkheadbox protein O1</i>) czynnik transkrypcyjny
FOXO3a	(ang. <i>Forkheadbox class O 3a</i>) czynnik transkrypcyjny
GBC-SD	linia komórkowa woreczka żółciowego
Granta-519	linia komórkowa chłoniaka
GSC	(ang. <i>glioblastoma stem-like cells</i>) komórki macierzyste glejaka
GSK-3β	(ang. <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>) 3-kinaza syntazy glikogenowej
H2A	histon H2A
H3K4	lizyna 4 histonu H3
H3K79	lizyna 79 histonu H3

H-RAS	(ang. <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>) ludzki homolog onkogenu H-ras obecny w wirusie mięsaka Harveya u szczurów
HCT116	linia komórkowa raka jelita grubego
HEC-1A	linia komórkowa raka endometrium
Hedgehog	szlak odgrywający istotną rolę w utrzymaniu właściwości komórek macierzystych
HepG2	linia komórkowa raka wątroby
HEPES	kwas 4- (2-hydroksyetylo) -1-piperazynoetanosulfonowy, czynnik buforujący
HEY2	(ang. <i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2</i>) czynnik transkrypcyjny
HL-60	linia komórkowa ostrej białaczki szpikowej
HSC	(ang. <i>hematopoietic stem cells</i>) hematopoetyczne komórki macierzyste
HTH	(ang. <i>helix-turn-helix</i>) struktura heliks-skręt-heliks
IL-6	(ang. <i>interleukin 6</i>) interleukina 6
ILK	(ang. <i>integrin-linked kinase</i>) kinaza związana z integrynami
INK4A/ARF	(ang. <i>inhibitor of kinase 4/alternative reading frame</i>) koduje białka p16 i p14
INPP4B	(ang. <i>inositol polyphosphate 4-phosphatase type II</i>) fosfataza zaangażowana w odłączenie grupy fosforanowej od (3,4,5)-trifosforanofosfatydyloinozytolu do fosfatydyloinozytolu 4,5-bisfosforanu
INPP5D	(ang. <i>inositol polyphosphate 5-phosphatase I</i>) fosfataza zaangażowana w odłączenie grupy fosforanowej od (3,4,5)-trifosforanu fosfatydyloinozytolu do fosfatydyloinozytolu 4,5-bisfosforanu
Ishikawa	linia komórkowa raka endometrium
JeKo-1	linia komórkowa chłoniaka
JVM-2	linia komórkowa chłoniaka
K-Ras	<i>K-Ras</i> (ang. <i>Kirsten ras oncogene homolog</i>) gen kodujący małe białko o aktywności GTP-azy
KLF4	(ang. <i>Krüppel-like factor 4</i>) czynnik transkrypcyjny
LC3-II	(ang. <i>microtubule-associated protein light chain 3</i>) białko zaangażowane w proces autofagii
LSC	(ang. <i>leukemic stem cells</i>) białczkowe komórki macierzyste

MAPKAPK2	(ang. <i>MAPK-activated protein kinase 2</i>) kinaza aktywowana mitogenami
MAVER-1	linia komórkowa chłoniaka
MCF-7	linia komórkowa raka piersi
MCL-1	(ang. <i>myeloid cell leukemia 1</i>) białko antyapoptotyczne
MDA-MB-231	linia komórkowa raka piersi
MDM2	(ang. <i>E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2</i>) ligaza ubikwitynowa E3
MeI18	czynn timeranskrypcyjny
MHCC97-H	linia komórkowa raka wątroby
MINO	linia komórkowa chłoniaka
MMP	(ang. <i>metalloproteinase</i>) metaloproteinazy
MOLM-13/14	linia komórkowa ostrej białaczki szpikowej
MRP1	(ang. <i>multi-drug resistance protein 1</i>) białko wpływające na chemiooporność komórek nowotworowych
mTORC2	(ang. <i>mTOR (mammalian target of rapamycin) complex 2</i>) kinaza serynowo-treoninowa
MTT	(ang. <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>) sól tetrazolowa(bromek 3-(4,5dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy)
MYCN	(ang. <i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)</i>) czynn timeranskrypcyjny
MV4-11	linia komórkowa ostrej białaczki szpikowej
NANOG	(ang. <i>Homeobox protein NANOG</i>) gen kodujący czynn timeranskrypcyjny
NCEB1	linia komórkowa chłoniaka
NF-κB	(ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>) czynn timeranskrypcyjny
NLS	(ang. <i>nuclear localization signal</i>) sygnał lokalizacji jądrowej
Notch	szlak sygnałowy odpowiedzialny za proliferację komórek
NPC	(ang. <i>Neural Progenitor Stem Cell</i>) neuronalne komórki progenitorowe
NVP-LDE-225/	inhibitor białka smoothed
Erismodegib	
OCI-ALM3	linia komórkowa ostrej białaczki szpikowej

OCT-4	(ang. <i>octamer-binding transcription factor 4</i>) gen kodujący czynnik transkrypcyjny
OvCa	linia komórkowa raka jajnika
OVCAR	linia komórkowa raka jajnika
p14	(ang. <i>protein 14</i>) białko o masie cząsteczkowej 14 kDa
p16^{INK4a}/Rb	(ang. <i>protein 16/Retinoblastoma</i>) szlak komórkowy zaangażowany w regulację cyklu komórkowego
p21	(ang. <i>protein 21</i>) białko o masie cząsteczkowej 21kDa, inhibitor kinaz zależnych od cyklin
p53	(ang. <i>protein 53</i>) białko o masie cząsteczkowej 53kDa, supresor nowotworów
PAF	(ang. <i>platelet-activating factor</i>) czynnik aktywujący płytki krwi
PARK2	(ang. <i>parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>) ligaza ubikwitynowa
PET	(ang. <i>polyethylene terephthalate</i>) politereftalanetylenu
PDGFRA 9	(ang. <i>platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>) gen kodujący receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu
PDK1	(ang. <i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>) kinaza zależna od fosfatydyloinozytolu
PE	(ang. <i>phosphatidylethanolamine</i>) fosfatydyloetanolamina
PEST	(ang. <i>proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)</i>) region białka bogaty w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę
PHLPP1/2	(ang. <i>PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 1/2</i>) fosfatazy zaangażowane w defosforylację kinazy AKT
PI3K	(ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>) 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
PIK3CA	(ang. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>) gen kodujący białko o aktywności kinazy serynowo-treoninowej
PINK1	(ang. <i>PTEN-induced kinase 1</i>) serynowo-treoninowa mitochondrialna kinaza białkowa
PIP2	(ang. <i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>) fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PIP3	(ang. <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase</i>) fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan
PMSF	fluorek fenylometrylosulfonylu, inhibitor proteaz serynowych
PODXL	(ang. <i>podocalyxin-like protein 1</i>) białko wpływające na chemiooporność komórek nowotworowych

POSTN	(ang. <i>periostin</i>) gen kodujący białko zaangażowane w adhezję i migrację komórek epitelialnych
PP2A	(ang. <i>protein phosphatase 2A</i>) fosfataza zaangażowana w defosforylację kinazy AKT
PR	(ang. <i>progesterone receptor</i>) receptor progesteronowy
pRB	(ang. <i>phosphorylation of Retinoblastoma</i>) fosforylowane białko retinoblastoma
PRC	(ang. <i>Polycomb Repressive Complexes</i>) kompleks represyjny Polycomb
PTC-028	(ang. <i>6-(5,6-difluoro-2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrazin-2-amine</i>) inhibitor BMI-1
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
PTC-596	(ang. <i>5-fluoro-2-(6-fluoro-2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrimidine-4,6-diamine</i>) inhibitor BMI-1
PTEN	(ang. <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>) białko supresorowe o aktywności fosfatazy
REC-1	linia komórkowa chłoniaka
RING1B	(ang. <i>really interesting New gene 1</i>) białko kompleksu PRC1
RIPK	(ang. <i>receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>) kinaza serynowo-treoninowa, białko oddziaływujące z receptorem
ROS	(ang. <i>reactive oxygen species</i>) reaktywne formy tlenu
RPMI-8226	linia komórkowa szpiczaka
SAHA	(ang. <i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid</i>) kwas suberanilohydroksamowy, inhibitor deacetylazhistonów
SALL4	(ang. <i>spalt-like transcription factor 4</i>) czynnik transkrypcyjny
SK-HEP1	linia komórkowa raka wątroby
SLUG	gen kodujący czynnik transkrypcyjny
sMEK1	(ang. <i>serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A</i>) białko stymulujące process apoptozy
SMMC-7721	linia komórkowa raka wątroby
Snail1	(ang. <i>zinc-finger transcription factors</i>) czynnik transkrypcyjny
Sox2	(ang. <i>sex determining region Y</i>) gen kodujący czynnik transkrypcyjny
Sp1	(ang. <i>specificity protein 1</i>) czynnik transkrypcyjny

SUNE-1 5–8F	linia komórkowa raka jamy nosowo-gardłowej
SUMO	(ang. <i>small ubiquitin-related modifier</i>) małe białko podobne do ubikwityny, biorące udział w sumoilacji
TE13	linia komórkowa raka przetyku
TIC	(ang. <i>tumor-initiating cells</i>) komórki inicjujące nowotwory
TNM	Klasyfikacja stopnia zaawansowania nowotworu
Twist1	(ang. <i>Twist-related protein 1</i>) czynnik transkrypcyjny
U251	linia komórkowa glejaka
U266	linia komórkowa szpiczaka
U-937	linia komórkowa ostrej białaczki szpikowej
ULK1/2	(ang. <i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2</i>) białkowe kinazy serynowo-treoninowe zaangażowane w proces autofagii
USP22	(ang. <i>Ubiquitin Specific Peptidase 22</i>) deubikwitynaza
XIAP	(ang. <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>) inhibitor aktywności kaspaz
γH2AX	Fosforylowana forma histonu H2AX, marker dwuniciowych pęknięć DNA
VEGF	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>) czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego
VEGF-C	(ang. <i>vascular endothelial growth factor C</i>) czynnik wzrostu naczyniowo-śródbłonkowy
VMP1	(ang. <i>vacuole membrane protein 1</i>) białko zaangażowane w proces autofagii
Wnt	(ang. <i>wingless-type like signaling</i>) szlak sygnałowy odgrywa istotną rolę w regulacji takich procesów jak embriogeneza, różnicowanie, przeżywalność i proliferacja komórek
Zeb1	gen kodujący czynnik transkrypcyjny będący represorem transkrypcyjnym E-kadheryny
Z138	linia komórkowa chłoniaka

Wstęp

Rak endometrium jest często występującym nowotworem wśród kobiet. Według American Institute for Cancer Research w 2018 na świecie zarejestrowano 380 000 zachorowań na raka endometrium (22). W Polsce rak endometrium jest czwartym pod względem zachorowalności nowotworem wśród kobiet (174).

Raka endometrium diagnozuje się przeważnie u kobiet w okresie około i pomenopauzalnym, u których często występuje otyłość, nadciśnienie tętnicze i cukrzyca (202). Istotną rolę w regulacji wzrostu błony śluzowej trzonu macicy odgrywają estrogeny i progesteron. Wykazano, że zbyt niski poziom progesteronu w porównaniu z poziomem estrogenów znacznie wpływa na zwiększenie ryzyka wystąpienia raka endometrium (18). Badania wykazują, że nadciśnienie współistniejące z cukrzycą i otyłością może również istotnie zwiększać ryzyko występowania raka endometrium (202, 273).

Czynnikami prognostycznymi w przypadku raka endometrium są wiek pacjentki, stopień histologicznej złośliwości nowotworu, stopień zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) oraz status receptora estrogenowego i progesteronowego (59). Pacjentki z nowotworami we wczesnym stopniu histologicznej złośliwości oraz niskim stopniu zaawansowania raka endometrium wg klasyfikacji FIGO, a także posiadające ekspresję receptora estrogenowego i progesteronowego wykazują lepsze rokowania (116).

Rozpoznanie raka endometrium oparte na ocenie zmian patomorfologicznych nie jest wystarczające w celu określenia odpowiedniego leczenia. Ustalenie odpowiedniego leczenia pooperacyjnego u pacjentek z rakiem endometrium pozostaje dla lekarzy dużym wyzwaniem. Stosowanie radioterapii i chemioterapii u pacjentek z rakiem endometrium prowadzi do wielu niekorzystnych zmian w organizmie i śmiertelności wśród pacjentek (30). Mimo prowadzonych badań nad podłożem molekularnym raka endometrium, jest ono nadal słabo poznane, ponieważ mało jest markerów molekularnych, które pozwalałyby na określenie ryzyka wystąpienia choroby, diagnozowanie czy monitorowanie leczenia (116). W związku z tym poszukuje się specyficznych biomarkerów molekularnych pozwalających na wczesne diagnozowanie, a w przyszłości także na opracowanie skuteczniejszych metod terapeutycznych, które uwzględniłyby molekularny kontekst i specyfikę nowotworu endometrium (30).

Jednym z najważniejszych szlaków przekazywania sygnałów w komórce włączonych w proces powstawania i progresji nowotworów jest szlak kinazy AKT (PKB, ang. *protein kinase B*). Zwiększona aktywność tego szlaku w komórkach nowotworowych może być wynikiem nadmiernej ekspresji receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, utraty ekspresji PTEN, czy amplifikacji albo mutacji w genach PI3K lub AKT (162). Zmiany w aktywności szlaku kinazy AKT są jedną z nieprawidłowości występujących w raku endometrium. Sugeruje się, że niska ekspresja fosfatazy PTEN może być zaangażowana w patogenezę i rozwój raka endometrium (62). Zmiany w ekspresji PTEN mogą być wynikiem mutacji w jego genie lub zmian na poziomie transkrypcji lub translacji. Wyniki ostatnich badań wykazują, że istotną rolę w rozwoju raka endometrium mogą odgrywać zmiany epigenetyczne. Jednym z czynników, które wpływa na regulację aktywności szlaku AKT jest BMI-1 (ang. *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) (69,131, 203). Białko BMI-1 wchodzi w skład kompleksu PRC1, który odpowiedzialny jest za ubikwitynylację lizyny 119 histonu H2A wpływającą na zahamowanie ekspresji genów. W komórkach nowotworowych często dochodzi do zaburzeń ekspresji tego białka, co wpływa na nieprawidłową regulację genów kontrolujących podziały i wzrost komórek, apoptozę oraz zdolność komórek do migracji i inwazji. Nadekspresja BMI-1 wpływa na wzrost inwazji, angiogenezy i metastazy, nowotworów, a także sprzyja oporności na chemio- i radioterapię wśród pacjentek (234).

Lepsze zrozumienie procesów zachodzących w komórkach nowotworowych, w które może być zaangażowane białko BMI-1 jest istotne w celu znalezienia bardziej skutecznych strategii terapeutycznych w leczeniu nowotworów.

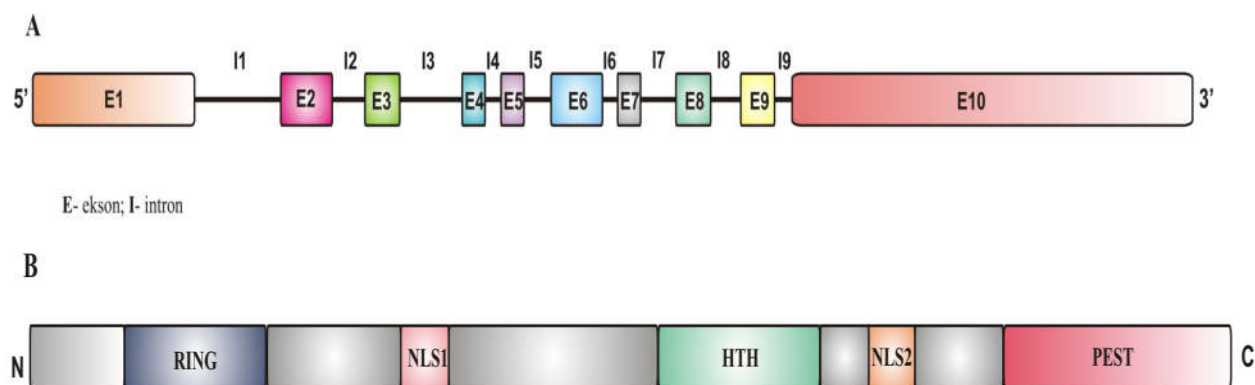
1. Charakterystyka białka BMI-1

1.1. Występowanie i struktura BMI-1

Białko BMI-1 kodowane jest u człowieka przez gen *BMI1* zawierający 10 eksonów i 9 intronów, który zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 10 (**Ryc. 1A**). Ekspresję genu *BMI1* obserwuje się niemal we wszystkich tkankach. Wyższy poziom ekspresji tego genu zaobserwowano w mózgu, gruczołach ślinowych, przełyku, płucach, jajnikach, jądrach, łożysku, krwi i szpiku kostnym oraz nerkach (200).

Gen *BMI1* koduje białko o masie cząsteczkowej 36,8 kDa, składające się z 326 aminokwasów (200). Funkcjonalne białko BMI-1 posiada trzy charakterystyczne regiony: N- terminalną domenę RING, centralną domenę heliks-skręt-heliks (HTH, ang. *Helix -*

turn-helix) oraz C terminalną domenę PEST (ang. *proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T)*). W skład domeny RING wchodzi potrójnie skręcona β -kartka, dwie pętle wiążące cynk, a także α -helisa. Domena RING odgrywa ważną rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, ponieważ BMI-1 dzięki niej może lokalizować się w obrębie pęknięć DNA. Podobną funkcję w strukturze białka BMI-1 odgrywa domena HTH, ponieważ ułatwia BMI-1 wiązanie do DNA. Domena PEST to region bogaty w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę, który ograniczony jest przez reszty zasadowe. Funkcją tej domeny jest kierowanie białka BMI-1 do degradacji, a brak aminokwasów w pozycji 236-326 w obrębie domeny PEST wpływa na wzrost półtrwania białka BMI-1, a także promowanie proliferacji komórek (17, 266). Białko BMI-1 w swojej strukturze posiada również dwa sygnały lokalizacji jądrowej NLS1 i NLS2 (ang. *nuclear localization signal*). Wyniki badań wykazały, że jedynie utrata sekwencji NLS2 może istotnie ograniczać lokalizację jądrową białka BMI-1 (**Ryc. 1B**) (17,52).



Rycina 1. Struktura genu (A) i białka BMI-1 (B).

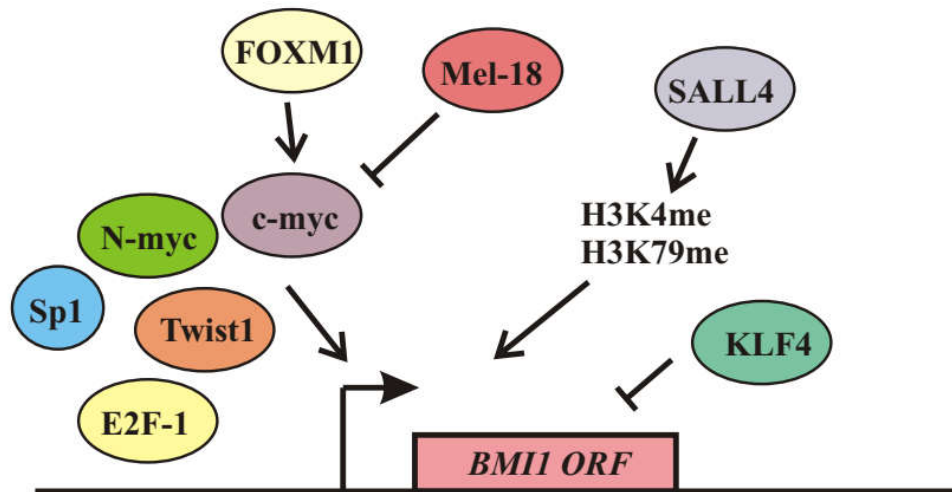
1.2. Regulacja ekspresji i aktywności BMI-1

1.2.1 Regulacja transkrypcji *BMI1*

Na regulację ekspresji genu kodującego białko BMI-1 wpływa szereg czynników transkrypcyjnych. Do czynników transkrypcyjnych, które wpływają na zwiększenie ekspresji *BMI1* należą MYCN (ang. *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)*), c-Myc (ang. *myelocytomatosis*), Twist1 (ang. *Twist-related protein 1*), FOXM1 (ang. *Forkhead Box M1*), E2F-1 (ang. *E2F transcription factor*

1), SALL4 (ang. *spalt-like transcription factor 4*), a na zmniejszenie ekspresji *BMI1* wpływają KLF4 (ang. *Krüppel-like factor 4*) i Mel18 (17).

c-Myc i MYCN regulują ekspresję *BMI1* poprzez wiązanie się do sekwencji E-box regionu promotorowego *BMI1*. Podobnie, SP1 wiąże się do regionu bogatego w pary GC poprzez co zwiększa ekspresję genu *BMI1* (17, 90, 173). Badania Wanga i wsp. (2003) (228) potwierdziły działanie c-Myc i Sp1 (ang. *specificity protein 1*) jako transaktywatorów *BMI1* oraz bezpośrednio oddziaływanie tych czynników na *BMI1* zarówno w warunkach *in vitro* jak *in vivo*. Ponadto, wyciszenie ekspresji c-Myc i Sp1 w linii komórkowej NPC (ang. *Neural Progenitor Stem Cell*) wpływa na zmniejszenie aktywności *BMI1* (228). Immunoprecypitacja chromatyny w komórkach linii nowotworu gardła FaDu wykazała, że Twist1 przyłącza się do sekwencji w obrębie regionu promotorowego *BMI-1* i wpływa na zwiększenie jego ekspresji (17, 268). W komórkach nowotworowych zwiększenie ekspresji *BMI1* przez Twist1 wpływa na nabycie przez te komórki cech komórek macierzystych (248). Czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w regulację transkrypcji *BMI1* jest FOXM1. Li i wsp. (2008) (129) wykazali, że FOXM1 przyłącza się do promotora genu kodującego czynnik transkrypcyjny c-Myc i wpływa na zwiększenie jego ekspresji. W wyniku zwiększonej ekspresji c-Myc dochodzi do zwiększonej ekspresji *BMI1* (17,129). Wykazano, że czynnik transkrypcyjny E2F-1 poprzez wiązanie się do promotorów *MYCN* oraz *BMI1* może zwiększać ich ekspresję w komórkach nerwiaka zarodkowego (173). Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, który pozytywnie wpływa na aktywność *BMI1* poprzez hipermetylację H3K4 oraz H3K79 w obrębie jego regionu promotorowego jest SALL4. Wyciszenie ekspresji *SALL4* w linii komórkowej białaczki HL-60 istotnie wpływało na spadek ekspresji *BMI-1* (268). Negatywnymi regulatorami ekspresji *BMI1* jest KLF4, który przyłączając się do promotora genu *BMI1* hamuje jego ekspresję oraz Mel-18, który hamuje ekspresję *BMI1* poprzez represję c-Myc. W linii komórkowej raka piersi MCF-7 wykazano, że obniżenie ekspresji *BMI-1* poprzez nadekspresję Mel-18 istotnie wpływa na poziom fosforylacji kinazy AKT na Ser473 oraz Thr308 (48, 81).



Rycina 2. Regulacja transkrypcji genu *BMI1* przez czynniki transkrypcyjne działające pośrednio lub bezpośrednio.

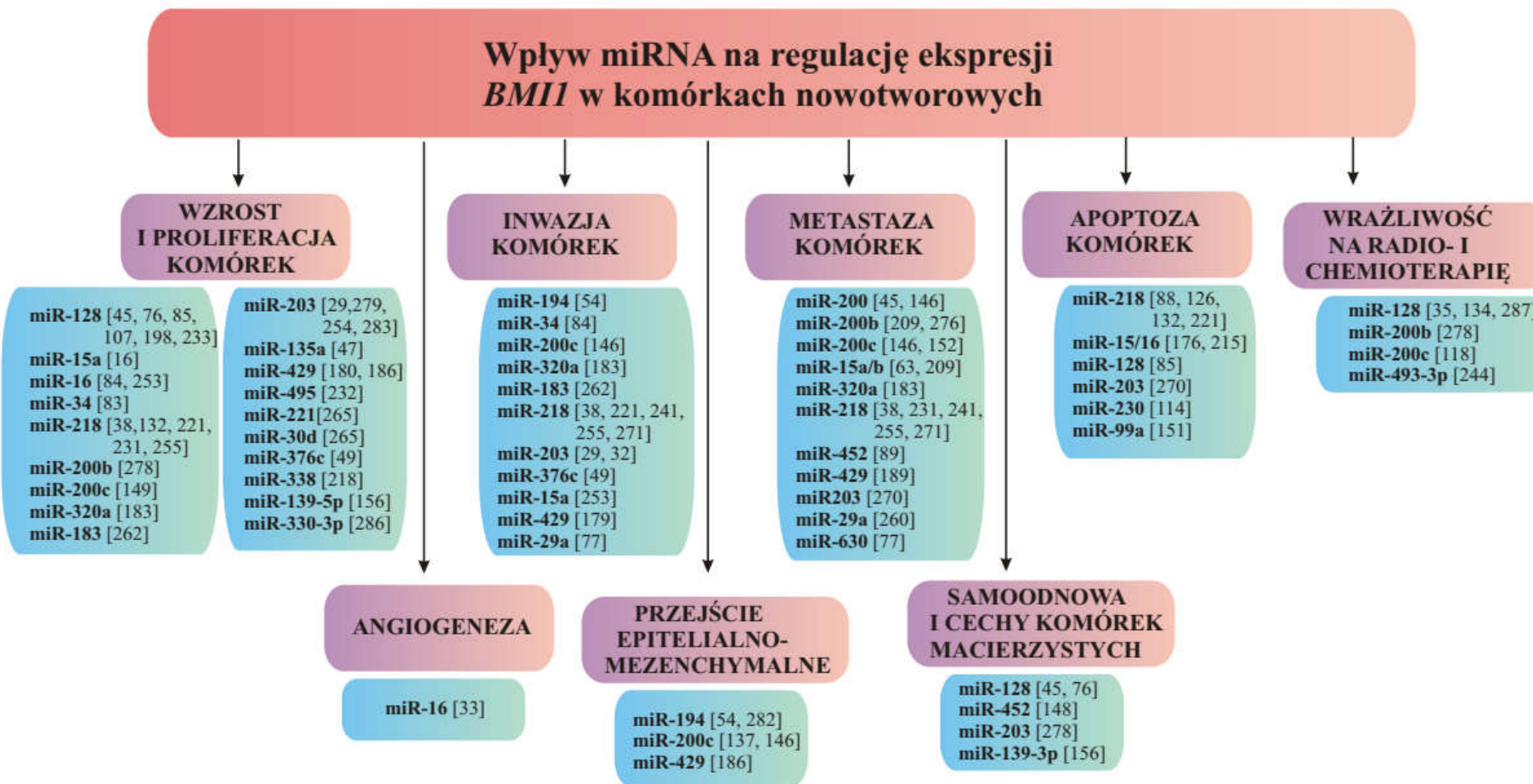
1.2.2. Regulacja potranskrypcyjna *BMI1*

miRNA to krótkie jednoniciowe cząsteczki RNA o długości 21-23 nukleotydów, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym poprzez komplementarność do regionów 3'-UTR w mRNA. Nieprawidłowa ekspresja miRNA może wpływać na zaburzenia w przebiegu procesów komórkowych, a przez to prowadzić do powstawania i progresji nowotworów (72). Zmiany w ekspresji miRNA związane są z delecją bądź amplifikacją genów je kodujących, zlokalizowanych w miejscach łamliwych chromosomów (179).

miRNA w komórkach nowotworowych mają wpływa na regulację aktywności onkogenów i genów supresorowych, przez co działają one jako supresory lub onkogeny (160). miRNA działa jako onkogen, kiedy obniżenie ekspresji miRNA wyciszającego onkogen, wpływa na wzrost ekspresji onkogeny. miRNA działa jako supresor nowotworów, kiedy wzrost ekspresji miRNA wpływa na obniżenie ekspresji genów supresorowych oraz promuje proces transformacji nowotworowej (160).

Ekspresja *BMI1* jest regulowana potranskrypcyjnie poprzez miRNA (**Ryc. 3**). Wykazano, że obniżenie ekspresji niektórych miRNA występujące często w komórkach nowotworowych może wpływać na wzrost ekspresji *BMI1*, a przez to odgrywać istotną rolę w regulacji wzrostu, proliferacji, inwazji i metastazy komórek, a także procesu apoptozy, angiogenezy, przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz nabycia przez komórki nowotworowe cech komórek macierzystych. Ponadto miRNA regulując ekspresję

BMI1 może istotnie wpływać na wrażliwość nowotworów na radio- lub chemioterapię (207).



Rycina 3. Potranskrypcyjna regulacja przez miRNA ekspresji *BMI1* w komórkach nowotworowych oraz jej związek z progresją nowotworów oraz wrażliwość na terapię.

1.2.3. Regulacja potranslacyjna BMI-1

Istotne znaczenie dla stabilności, lokalizacji oraz funkcji białka BMI-1 mają modyfikacje potranslacyjne, do których należą sumoilacja, fosforylacja i ubikwitynylacja.

Sumoilacja jest to modyfikacja polegająca na kowalencyjnym przyłączeniu białka SUMO (ang. *small ubiquitin-related modifier*) do substratu białkowego. Przyłączenie następuje pomiędzy resztą glicyny białka SUMO oraz grupą α -aminową lizyny substratu za pomocą wiązania izopeptydowego (245). Sumoilacja reguluje szereg procesów komórkowych, przede wszystkim wpływa na represję transkrypcji, organizację chromatyny oraz stabilność genomu. Wykazano, że białko BMI-1 ulega sumoilacji na lizynie 88 przez CBX4 (ang. *chromobox domain containing proteins 4*) w wyniku uszkodzenia DNA poprzez co może gromadzić się w miejscach uszkodzeń DNA (98).

Stabilność i funkcja białka BMI-1 regulowana jest również poprzez ubikwitynylację w domenie PEST przez ligazę ubikwitynową β TrCP (ang. *β -transducing repeat-containing protein*) (193). Wykazano, że nadekspresja β TrCP w komórkach MCF-10A wpływała na degradację białka BMI-1 w proteasomach, a wyciszenie β TrCP wpływało na ograniczenie degradacji BMI-1 oraz zwiększenie właściwości proonkogennych tego białka (193).

Istotną rolę w procesach różnicowania i rozwoju odgrywa fosforylacja białka BMI-1 przez kinazę MAPKAPK3 (3pK, ang. *MAPKAPK3, mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3*). W wyniku nadekspresji 3pK dochodzi do fosforylacji zarówno BMI-1 jak i innych białek Polycomb, co wpływa na ich oddysocjowanie od chromatyny oraz aktywację transkrypcji *locus* INK4A/ARF (ang. *inhibitor of kinase 4/alternative reading frame*) (225).

Białko BMI-1 może być również fosforylowane w szlaku PI3K/AKT (ang. *phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B*), fosforylacja BMI-1 przez AKT w zależności od fosforylowanej reszty może odmiennie działać na onkogenne właściwości tego białka. Liu i wsp. (2012) (147) wykazali, że fosforylacja BMI-1 przez AKT na Ser316. wpływa na zmniejszenie ubikwitynylacji histonu H2A przez kompleks PRC1, co uniemożliwia jego przyłączenie się do *locus* INK4A/ARF. Modyfikacja ta wpływa na zahamowaniu zdolności białka BMI-1 do promowania także proliferacji komórki wzrostu guzów nowotworowych. Ponadto fosforylacja ta wpływa na zahamowanie zdolności do samoodnowy hematopoetycznych komórek macierzystych oraz progenitorowych (147). Fosforylacja BMI-1 na resztach seryny 251, 253, 255 w komórkach raka stercza u myszy wpływa na zwiększenie ubikwitynylacji H2A przez kompleks PRC1 i wzmacnia onkogeny potencjał tego białka, który jest

niezależny od hamowania *locus* INK4A/ARF (168). Fosforylacja białka BMI-1 w zależności od modyfikowanej reszty może odmiennie wpływać na onkogenne właściwości tego białka.

2. Rola białka BMI-1 w procesach komórkowych

2.1. Białko BMI-1 jako regulator cyklu komórkowego

Istotną rolę w proliferacji komórek odgrywa cykl komórkowy, którego regulacja i progresja jest ściśle kontrolowana. Przebieg cyklu jest regulowany za pomocą szlaków komórkowych p16^{INK4a}/Rb (ang. *protein 16/Retinoblastoma*) oraz Arf/p53 (ang. *ADP-ribosylation factor/protein 53*). Wykazano, że szlaki te mogą być regulowane przez białko BMI-1. BMI-1 regulując obydwa szlaki wpływa na transformację nowotworową, a także sprzyja samoodnowie nowotworowych komórek macierzystych (CSC, ang. *cancer stem cells*) (17, 230). W wyniku braku ekspresji p16^{INK4a} podczas cyklu komórkowego dochodzi do hiperfosforylacji pRB przez kompleks kinaz zależnych od cyklin CDK4 oraz CDK6 (ang. *cyclin-dependent kinase*). Hiperfosforylacja czynnika pRB powoduje, że czynnik ten nie wiąże i nie hamuje czynnika transkrypcyjnego E2F, w wyniku czego dochodzi do transkrypcji genów zaangażowanych w przejście z fazy G1 do S. Udowodniono, że zahamowanie ekspresji BMI-1 wpływa na ekspresję p16^{INK4a} oraz zapobiega wiązaniu CDK4/6 z cykliną D, co wpływa na aktywność tej kinazy. p19^{Arf} poprzez wiązanie z ligazą ubikwitynylową MDM2 (ang. *E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2*) zapobiega degradacji oraz inaktywacji białka supresorowego p53. BMI-1 przyłączając się do promotora genu p19^{Arf} wpływa na zahamowanie jego ekspresji oraz nagromadzenia czynnika MDM2 wpływającego na degradację białka p53, co w rezultacie prowadzi do zahamowania procesu apoptozy oraz niekontrolowanej proliferacji komórek (39, 56, 74, 188, 211).

Nadekspresja *BMI1* w linii komórkowej raka piersi MCF-7 oraz raka prostaty DU145, u których podwójne pęknięcia indukowano etopozydem, wpływała na obniżenie fosforylacji Ser1981 oraz Thr68 kinazy CHK2 (ang. *checkpoint kinase 2*), a także poziomu γ H2AX oraz aktywację punktu kontrolnego G2/M (242). W komórkach raka jamy nosowo-gardłowej SUNE-1 i 5–8F wyciszenie *BMI-1* i napromieniowanie komórek wpływało na akumulację komórek w fazie G1 oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M (263).

2.2. Rola BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT

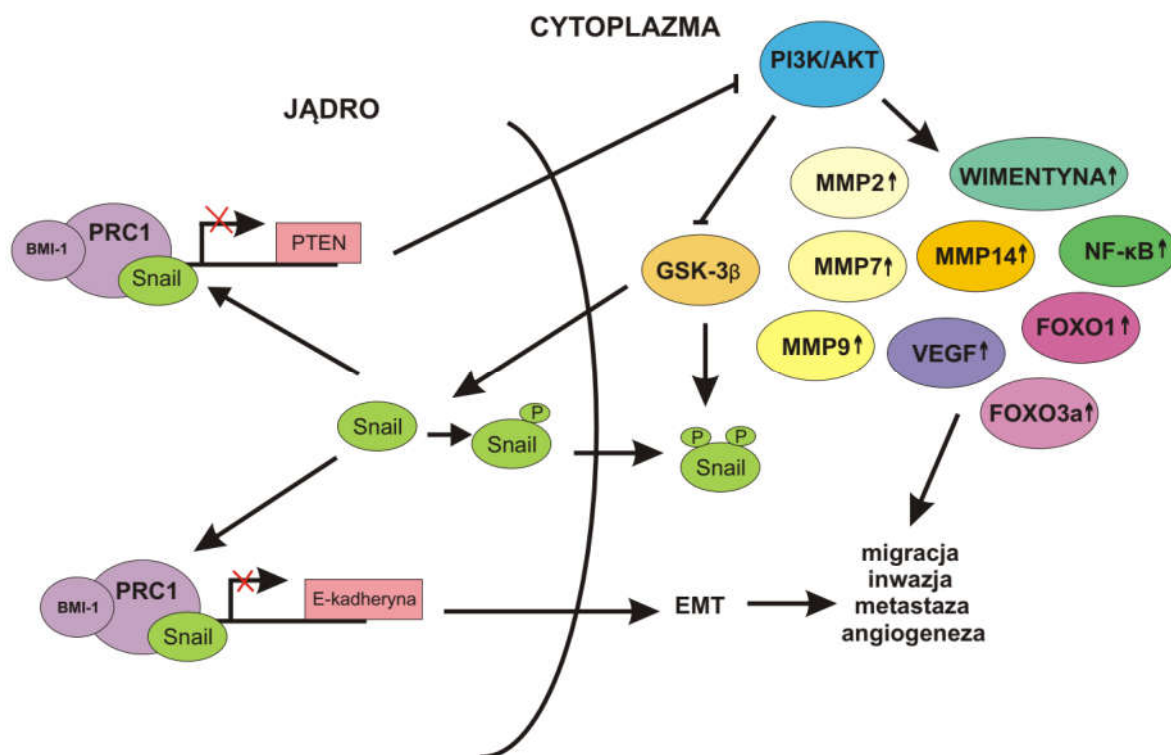
Szlak kinazy białkowej AKT odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu, cyklu komórkowego, apoptozy czy transkrypcji genów (111). Kinaza AKT jako serynowo-treoninowa kinaza jest aktywowana przez różne czynniki wzrostowe oraz insulinę i wpływa na proliferację komórek. W niektórych nowotworach często obserwuje się mutacje występujące w regulatorach szlaku kinazy AKT. Na wzrost aktywności kinazy AKT mogą wpływać onkogenne kinazy tyrozynowe oraz utrata ekspresji negatywnych regulatorów tego szlaku, przede wszystkim fosfatazy PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) (122, 147).

Kinaza AKT aktywowana jest insuliną, cytokinami i czynnikami wzrostu, które przyłączają się do receptorów o charakterze kinaz tyrozynowych i wpływają na ich aktywację poprzez ich autofosforylację oraz rekrutację do błony komórkowej 3-kinazy fosfatydyloinozytoli (PI3K). Kinaza ta wpływa na przekształcenie fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP2, ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3, ang. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*), który rekrutuje do błony kinazę PDK1 (ang. *phosphoinositide-dependent kinase 1*), fosforylującą odpowiednią resztę Thr w domenie kinazowej kinazy AKT. Do pełnej aktywacji kinazy AKT jest niezbędna fosforylacja Ser473/4 przede wszystkim przez kinazy PDK1 i mTORC2 (ang. *mTOR (mammalian target of rapamycin) complex 2*) (161). Za defosforylację kinazy AKT odpowiada kilka fosfataz, które mogą wpływać na ten proces pośrednio lub bezpośrednio. PTEN, INPP4B (ang. *inositolpolyphosphate 4-phosphatase type II*), INPP5D (ang. *inositolpolyphosphate 5-phosphatase I*) są fosfatazami, które poprzez defosforylację PIP3 do PIP2, wpływają pośrednio na defosforylację AKT. PP2A (ang. *Protein phosphatase 2A*), PHLPP1, PHLPP2 (ang. *PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase1/2*) są zaangażowane w bezpośrednią defosforylację kinazy AKT (1, 240).

Wyniki ostatnich badań sugerują, że istotną rolę w regulacji aktywności kinazy AKT może odgrywać białko BMI-1 (131). W większości nowotworów BMI-1 poprzez zahamowanie ekspresji PTEN może wpływać na wzrost fosforylacji kinazy AKT. Song i wsp. (2009) (203) wykazali, że w nowotworze jamy gardłowo-nosowej nadekspresja BMI-1 wpływa na wzrost aktywności kinazy AKT i przyczynia się do przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial and mesenchymal transition*) związanego głównie z utratą ekspresji E-kadheryny. Białko BMI-1 wchodzące w skład PRC1, przyłączając się do locus *PTEN* obniża jego ekspresję powodując aktywację szlaku PI3K/AKT/GSK-3 β (ang. *glycogen synthase kinase 3 beta*), który wpływa na stabilizację czynnika transkrypcyjnego Snail1 (ang. *zinc-*

finger transcription factors) poprzez jego fosforylację. W konsekwencji PRC1 wraz ze Snail1 łączy się z promotorem genu E-kadheryny co skutkuje obniżeniem jej ekspresji oraz prowadzi do zwiększenia potencjału inwazyjnego komórek przez obniżenie ich zdolności do adhezji (**Ryc. 4**) (203). Ponadto BMI-1 poprzez aktywację szlaku kinazy AKT wpływa również na wzrost ekspresji wimentyny oraz metaloproteinaz 2,7,9,14 (MMP; ang. *metalloproteinase*) w nowotworach żołądka oraz wzrost ekspresji MMP2, MMP9 oraz VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) w liniach komórkowych raka wątroby HepG2 oraz MHCC97-H poprzez co przyczynia się do wzrostu migracji, inwazji, metastazy komórek i angiogenezy (**Ryc. 4**) (131, 255). W linii komórkowej glejaka U251 wykazano, że wyciszenie ekspresji *BM11* znacznie wpływa na obniżenie ekspresji FOXO1 (ang. *Forkheadbox protein O1*), FOXO3a (ang. *Forkheadbox class O 3a*) i spadek fosforylacji kinazy AKT, w wyniku czego dochodzi do spadku migracji i wzrostu apoptozy komórek (112). Wyciszenie ekspresji *BM11* w linii komórkowej czerniaka A375 wpływało na wzrost ekspresji PTEN i prowadziło do spadku fosforylacji AKT oraz NF-κB (**Ryc. 4**) (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), a także do obniżenia ekspresji MMP2, co w konsekwencji obniżało potencjał komórek do inwazji i migracji (150).

Cannon i wsp. (2014) wykazali, że BMI-1 poprzez regulację fosforylacji AKT może wpływać na modulowanie wrażliwości na insulinę w hepatocytach myszy. Hepatocyty wyizolowane od myszy $Bmi^{+/-}$ wykazywały niższy poziom fosforylacji niż hepatocyty wyizolowane od myszy $Bmi^{+/+}$. Jednak po stymulacji insuliną poziom fosforylacji AKT był znacznie wyższy w hepatocytach $Bmi^{+/-}$ niż $Bmi^{+/+}$, co sugeruje, że potrzeba mniej insuliny do utrzymania prawidłowej homeostazy glukozy u heterozygotycznych myszy. Podobną zależność zaobserwowano w mięśniach tych myszy (25).



Rycina 4. Wpływ BMI-1 na regulację szlaku kinazy AKT (opis w tekście).

2.3. Udział BMI-1 w procesie apoptozy i autofagii komórek

Apoptoza jako programowana śmierć komórki odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu proliferacji w odpowiedzi na uszkodzenia w materiale genetycznym (71). Apoptoza odgrywa znaczącą rolę w zachowaniu homeostazy, ponieważ poprzez ten proces zostaje utrzymana równowaga między proliferacją, a eliminacją uszkodzonych komórek. Zachwianie tej równowagi sprzyja rozwojowi wielu chorób w tym również nowotworom i następuje często w wyniku obniżenia ekspresji genu supresorowego *TP53*. Produkt białkowy tego genu, białko p53 pełni rolę „strażnika genomu”, ponieważ wpływa na zahamowanie cyklu komórkowego lub indukcję apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Wykazano, że białko BMI-1 może istotnie wpływać na regulację procesu apoptozy w komórkach nowotworowych w sposób zależny od p53 (88, 184).

Jiao i wsp. (2019) (105) wykazali, że w komórkach raka woreczka żółciowego GBC-SD, wyciszenie ekspresji *BMI1* ma wpływ na spadek ekspresji cykliny D1 i CDK2 oraz BCL-2 (ang. *B-cell lymphoma 2*), a wzrost białka proapoptotycznego BAX (ang. *Bcl-2-like protein 4*) oraz kaspazy 3, co przyczynia się do apoptozy tych komórek (105). Jagani i wsp. (2010) (100) wykazali, że w komórkach szpiczaka RPMI-8226 dochodzi do zwiększenia ekspresji

proapoptotycznego białka BIM (ang. *Bcl-2-like protein 11*) po zahamowaniu ekspresji BMI-1. Jagini i wsp. (2010) wykazali, że BMI-1 lokalizuje się w miejscu promotorowym *BIM*, przez co może regulować jego ekspresję. Ponadto wyciszenie zarówno *BMI1* jak *BIM* hamowało proces apoptozy (100).

BMI-1 ma istotny wpływ na wrażliwość komórek na promieniowanie jonizujące. Wyciszenie ekspresji *BMI1* w komórkach raka przełyku ECA109 i TE113 poddanych napromieniowaniu promowało proces apoptozy tych komórek poprzez zmniejszenie ekspresji MCL-1 (ang. *myeloid cell leukemia 1*) oraz zwiększenie ekspresji Bax, ale również zmniejszenie fosforylacji kinazy AKT (272). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku raka jamy nosowo-gardłowej, raka piersi, kostniakomięsaka, glejaka (130, 145, 249, 263)

Wykazano, że BMI-1 może odgrywać kluczową rolę w chemiowrażliwości. Wu i wsp. (2014) (252) udowodnili, że wyciszenie ekspresji *BMI1* w komórkach szpiczaka RPMI8226 i U266 wzmacniało indukcję apoptozy po traktowaniu bortezomibem co skutkowało wzrostem stosunku Bcl-2/Bax (252). Podobnie, wyciszenie ekspresji *BMI1* zarówno w komórkach linii raka wątroby SK-HEP-1 i SMMC-7721 traktowanych 5-fluorouracylem, jak i w komórkach linii raka piersi MCF-7 traktowanych doksorubicyną wpływało znacząco na aktywację procesu apoptozy (247, 251). W raku jajnika wyciszenie ekspresji *BMI1* oraz traktowanie cisplatyną zwiększało produkcję ROS (ang. *reactive oxygen species*) oraz indukowało apoptozę poprzez zwiększenie ekspresji kaspaz 8 i 9 (229, 247).

BMI-1 znacząco wpływa na metastazę i progresję raka jajnika poprzez hamowanie ekspresji sMEK1 (ang. *serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A*), który stymuluje proces apoptozy poprzez regulację ekspresji białek apoptotycznych lub zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego takich jak p21 (ang. *protein 21*), cyklina D1, p53 czy Bcl-2 (113).

Wykazano również, że zastosowanie inhibitorów BMI-1 w komórkach chłoniaka (Z-138, JVM-2, Granta-519, MINO, JeKo-1, REC-1, MAVER-1, NCEB-1) lub ostrej białaczki szpikowej (MOLM-13, MOLM-14, OCI-AML3, MV4-11, U-937, HL-60) znacznie wpływało na aktywację szlaku zewnętrznego apoptozy lub niezależnie od p53 (159, 172). Jeden z inhibitorów BMI-1, PTC-028 (ang. *6-(5,6-difluoro-2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrazin-2-amine*) hamując ekspresję BMI-1 poprzez jego hiperfosforylację wpływa na spadek ilości ATP (ang. *adenosine triphosphate*) oraz indukcję mitochondrialnych reaktywnych form tlenu, co skutkuje zmniejszeniem ekspresji RIPK (ang. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) oraz XIAP (ang. *X-linked inhibitor of apoptosis*) prowadząc do aktywacji kaskady kaspaz. Ponadto, kaspazy również wpływają na

spadek ekspresji RIPK1, a RIPK1 na spadek ekspresji NFκB oraz XIAP. Aktywacja tych szlaków kieruje komórkę na szlak apoptotyczny (51). Wyciszenie lub zahamowanie ekspresji BMI-1 również znacznie wpływa na wzrost procesu apoptozy w komórkach nowotworowych przełyku, żołądka, jamy nosowo-gardłowej, krtani, piersi, trzustki okrężnicy i szpiczaka (7, 69, 204, 237, 261, 263, 274, 284).

Innym typem śmierci komórki jest autofagia. Proces autofagii polega na degradacji wielkocząsteczkowych składników cytoplazmy oraz całych organelli. Podczas autofagii fragment cytoplazmy zostaje otoczony przez formującą się podwójną błonę tworzącego się pęcherzyka (autofagosomu), który następnie łączy się z lizosomem i ulega degradacji. W proces autofagii zaangażowane są cztery kompleksy białkowe. W skład pierwszego kompleksu wchodzi białkowe kinazy serynowo-treoninowe Atg1/ULK1/2 (*ang. autophagy related 1/Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2*), które regulowane są aktywnością kinazy mTOR. Drugi kompleks składa się z lipidowych kinaz i pośredniczy w nukleacji pęcherzyków. Trzeci i czwarty kompleks to ubikwitynopodobne systemy koniugujące Atg12-Atg5 (*ang. autophagy related 12/5*) oraz Atg8-PE (*ang. autophagy related 8/phosphatidylethanolamine*), pośredniczące we wzroście pęcherzyków. W procesie autofagii uczestniczą również dwa przezbłonowe białka Atg9/mAtg9 (*ang. autophagy related 9/mammalian autophagy related 9*) oraz VMP1 (*ang. vacuole membrane protein 1*), które uczestniczą w recyrkulacji białek Atg (182).

Autofagia umożliwia utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy, a także przeżycie komórek w warunkach stresowych. Proces autofagii odgrywa istotną rolę w patogenezie licznych chorób, w tym również nowotworów (182).

Zahamowanie ekspresji BMI-1 w komórkach raka jajnika OVCAR4 i CP20 istotnie stymuluje proces autofagii, poprzez formowanie się fagoforów i autofagosomów. Wykazano również, że regulacja autofagii przez BMI-1 w tych komórkach jest zależna od obecności ATP. W wyniku wyciszenia ekspresji *BM11* w komórkach linii raka endometrium OvCa dochodzi do spadku poziomu ATP, który wpływa na utratę potencjału błony mitochondrianej. Depolaryzacja błony wpływa na jej dysfunkcję co powoduje akumulację PINK1 (*ang. PTEN-induced kinase 1*) oraz PARK2 (*ang. parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*) i indukcję autofagii mitochondriów. Zarówno indukcja autofagii jak i mitoautofagii w komórkach z zahamowaną ekspresją *BM11* wpływała na aktywację procesu nekroptozy tych komórek (50).

Wyciszenie ekspresji *BM11* w komórkach raka piersi MDA-MB-231 wpływało na zwiększoną fosforylację białka p38 na Thr180 i Tyr182, a zmniejszoną fosforylację kinazy AKT na Ser473 i wpływało na wzrost procesu autofagii komórek. Wyciszenie ekspresji *BM11* w tych

komórkach po napromieniowaniu znacznie wzmacniało proces autofagii (73). Zmniejszona ekspresja *BMI1* w komórkach traktowanych 5-fluorouracylem indukowała również proces autofagii poprzez szlak Bcl-2/Beklina-1 oraz akumulację LC3-II (ang. *microtubule-associated protein light chain 3*) (251).

2.4. Wpływ BMI-1 na starzenie się komórek

Starzenie jest to proces, w którym dochodzi do zatrzymania proliferacji komórek. Uważa się, że jest to proces nieodwracalny, bo żaden bodziec fizjologiczny nie stymuluje komórek starzejących do ponownego rozpoczęcia cyklu komórkowego. W procesie starzenia obserwuje się zmiany w ekspresji genów oraz organizacji chromatyny, co prowadzi do zwiększonego wydzielania chemokin, cytokin oraz czynników wzrostu (24). Ponadto, starzejące komórki powiększają swoje rozmiary. Obserwuje się u nich wzrost ziarnistości, wzrost poziomu lipofuscyny oraz aktywności β -galaktozydazy czy tworzenie się heterochromatyny. W starzejących się komórkach dochodzi do zmian w ekspresji białek cytoszkieletu przede wszystkim wimentyny, tubuliny czy β -aktyny (6). Wyróżniamy dwa typy starzenia komórkowego tj. replikacyjne i przyspieszone. Starzenie replikacyjne związane jest ze skracaniem telomerów i wyczerpaniem limitu podziałowego komórek. Starzenie przyspieszone jest niezależne od skracania telomerów i może być indukowane stresem oksydacyjnym, czynnikami uszkodzającymi DNA oraz onkogenami (19).

Badania dowodzą, że istotną rolę w ekspresji genów związanych ze starzeniem komórek mogą odgrywać mechanizmy epigenetyczne, które wpływają na remodeling struktury chromatyny. Jednym z takich czynników jest białko BMI-1. Wykazano, że nadekspresja BMI-1 w ludzkich fibroblastach płuc hamuje szlak $p16^{\text{INK4A}}$, co wiąże się z zahamowaniem procesu starzenia niezależnego od skracania telomerów (99). Ball i wsp. (2005) w ludzkich komórkach serc płodu oraz Jin i wsp. (2017) w komórkach nerki zaobserwowali, że jednoczesny spadek ekspresji *BMI-1* oraz wzrost $p16^{\text{INK4A}}$ świadczył o procesie starzenia tych komórek (10, 108). Badania wykazują, że stres oksydacyjny wpływając na szlak BMI-1/ $p16^{\text{INK4A}}$ odgrywa również istotną rolę w procesie starzenia się komórek macierzystych miazgi zęba (163).

W ludzkich keranocytach nadekspresja *Ets-1* (ang. *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)*) oraz zahamowanie ekspresji BMI-1 wpływało na zwiększoną ekspresję $p16^{\text{INK4A}}$ i indukowało ich przedwczesne starzenie się (43). Istotną rolę w regulacji aktywności BMI-1 odgrywa czynnik transkrypcyjny c-Myc. W multipotencjalnych

komórkach macierzystych zaobserwowano, że wiązanie c-Myc do promotora *BMI1* ulega zmniejszeniu podczas starzenia się tych komórek (110). Aktywność białka BMI-1 jest regulowana przez jego modyfikacje potranslacyjne takie jak ubikwitynylacja czy fosforylacja. β TrCP jest enzymem zaangażowanym w ubikwitynację białka BMI-1 prowadzącą do jego degradacji. Badania sugerują, że regulacja ekspresji BMI-1 przez β TrCP może wpływać istotnie na proces starzenia i mieć znaczenie w rozwoju chorób związanych z wiekiem (193). Ponadto, sugeruje się, że AKT fosforylując białko BMI-1 ogranicza jego zdolność do wiązania do locus p16^{INK4A} i wpływa na indukcję procesu starzenia w warunkach *in vivo* (267).

W regulację ekspresji BMI-1 mogą być również zaangażowane miRNA. W starzejących komórkach obserwuje się wzrost ekspresji niektórych miRNA tj. miR-141, miR-31, miR-495, które hamując ekspresję BMI-1 wpływają na szlaki zaangażowane w proces starzenia komórek (53, 40, 138).

Zahamowanie ekspresji BMI-1 w neuronach znacznie wpływa na wzrost ekspresji IL-6 (ang. *interleukin 6*) oraz p53. Zależność ta sugeruje, że niedobór BMI-1 w neuronach zwiększa aktywność p53, które wpływa na proces starzenia mózgu, ale również rozwój chorób neurodegeneracyjnych (5).

W mysich embrionalnych fibroblastach jednoczesne zahamowanie ekspresji BMI-1 oraz inaktywacja p53 zahamowywało ich przedwczesne starzenie. W modelu mysim C57BL/6, analiza Kaplana-Meyera wykazała, że utrata jednego allela *Bmi1* skróciła długość życia o 35 % (31). Podobne zjawisko zaobserwowali El Hajjar i wsp. (2019), ponadto wiązało się ono ze wzrostem zachorowalności tych myszy na choroby neurodegeneracyjne (58).

Badania na szczurzym modelu sugerują, że D-galaktoza wpływa na hamowanie szlaku sygnalizacyjnego Wnt/ β -katenina (ang. *wingless-type like signaling*) oraz obniżenie ekspresji BMI-1 co wzmacniało proces starzenia w korze słuchowej i prowadziło do jej neurodegeneracji (256).

Rozdział 3. Udział białka BMI-1 w procesie nowotworzenia

3.1. Rola BMI-1 w prawidłowych i nowotworowych komórkach macierzystych

Ważną rolę w rozwoju nowotworów mogą odgrywać małe populacje komórek mających zdolność do samoodnowy i różnicowania. Komórki o takich cechach to nowotworowe komórki macierzyste (CSC, ang. cancer stem cells). Komórki te wpływają na różnorodność komórek znajdujących się w obrębie guza i przyczyniają się do jego heterogenności. CSC

mają zdolność do inicjacji zmian nowotworowych, gdy zostaną przeszczepione do organizmów zwierzęcych, wtedy komórki takie określa się jako komórki inicjujące nowotwory (TIC, ang. *tumor-initiating cells*). Nowotworowe komórki macierzyste mają zdolność do samoodnowy oraz różnicowania w różne typy komórek, ale wykazują małą aktywność proliferacyjną oraz oporność na działanie czynników uszkodzających DNA. Charakteryzują się również obecnością markerów powierzchniowych (CD, ang. *cluster of differentiation*), np. CD24, CD29, CD44, CD90 CD133 oraz ekspresją genów zaangażowanych w samoodnowę komórek macierzystych *Sox2* (ang. *sex determining region Y*), *Nanog* (ang. *Homeobox protein NANOG*), *Oct4* (ang. *octamer-binding transcription factor 4*) i aktywacją szlaków komórkowych Notch, Hedgehog, Wnt. Obecne badania sugerują, że CSC oprócz indukcji nowotworów mogą wpływać na ich progresję, metastazę, wznowę oraz oporność na leczenie (11, 65, 70, 181, 212).

Wykazano, że ważną rolę w przeżyciu i samoodnowie prawidłowych i nowotworowych komórek macierzystych może odgrywać białko BMI-1. W hematopoetycznych komórkach macierzystych (HSC, ang. *hematopoietic stem cells*) oraz białaczkowych komórkach macierzystych (LSC, ang. *leukemic stem cells*) białko to odgrywa kluczową rolę w regulacji ich proliferacji (128). W mysim modelu białaczki Bmi-1 jest niezbędne do utrzymania puli nowotworowych komórek macierzystych, a także ich proliferacji. Brak ekspresji Bmi-1 w tych komórkach wpływa na utratę przez te komórki zdolności do samoodnowy oraz wykazywanie cech różnicowania oraz apoptozy. Ponadto komórki te w przypadku braku ekspresji Bmi-1 nie są zdolne do inicjowania białaczki (128). BMI-1 może również wpływać na zdolność do inicjowania nowotworów w przypadku nowotworowych komórek macierzystych stercza, piersi, jamy nosowo-gardłowej, krtani, żołądka, wątroby (13, 39, 107, 142, 155, 157, 243, 264, 284). Mechanizm przez który BMI-1 promuje samoodnowę prawidłowych i nowotworowych komórek macierzystych to represja przez to białko *locus* INK4A/ARF i wpływ na szlaki sygnałowe związane z proliferacją, starzeniem oraz apoptozą takie jak p16^{INK4A}/Rb oraz ARF/p53 (39; 74; 166).

W komórkach macierzystych nowotworu piersi wykazano, że wyciszenie ekspresji *BMI1* znacznie wpływało na obniżenie ekspresji markera powierzchniowego CD49f oraz ograniczało ich zdolność do samoodnowy i klonogenność (206). Badania sugerują również, że wzajemna regulacja pomiędzy BMI-1 oraz USP22 (ang. *Ubiquitin Specific Peptidase 22*) ma istotny wpływ na nabywanie cech komórek macierzystych przez komórki glejaka przez regulację genów: *POSTN* (ang. *periostin*), *HEY2* (ang. *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2*), *PDGFRA 9* (ang. *platelet-derived growth factor receptor, alpha*

polypeptide) i *ATF3* (ang. *cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3*) (187). Mimo, że BMI-1 może odgrywać istotną rolę w nabywaniu przez komórki nowotworowe cech komórek macierzystych, Vora i wsp. (2019) (226) wykazali, że BMI-1 może wpływać na samoodnowę i proliferację nowotworowych neuronalnych komórek macierzystych *in vitro*, ale nie wpływała skutecznie na transformację nowotworową w neuronalnych komórkach macierzystych *in vivo* (226).

Białko BMI-1 może w nowotworowych komórkach macierzystych wpływać na ich zdolności do metastazy, a także chemiooporność. W nowotworowych komórkach macierzystych trzustki BMI-1 hamując ekspresję *PTEN* i aktywując szlak kinazy białkowej AKT, wpływa na ich zdolność do inwazji i metastazy (235). W populacji komórek macierzystych raka wątroby wykazujących ekspresję CD133, udowodniono, że nadekspresja BMI-1 w tych komórkach promowała przejście epithelialno-mezenchymalne komórek poprzez zmniejszenie ekspresji E-kadheryny i zwiększenie ekspresji wimentyny, a także wzmacniała potencjał komórek do migracji i inwazji (285). W komórkach nowotworowych błony śluzowej trzonu macicy wyciszenie ekspresji *BMI1* znacznie obniżało zdolność tych komórek do nabywania cech komórek macierzystych przez zahamowanie SOX2 i OCT4 (115).

W komórkach raka głowy i szyi, cisplatyna indukując ekspresję BMI-1 przyczynia się do zwiększenia populacji komórek wykazujących cechy komórek macierzystych (35). W komórkach raka jajnika wykazano zwiększoną oporność na działanie paklitakselu i cisplatyny, a także zwiększenie ekspresji markerów komórek macierzystych, przede wszystkim BMI-1, NANOG, NOTCH, OCT4 (281). Znaczne zmniejszenie proliferacji, zdolności do tworzenia kolonii, inwazji i migracji oraz wrażliwości na cisplatinę zaobserwowano w komórkach raka nosogardła wykazujących ekspresję CD44, u których wyciszono ekspresję BMI-1. Brak ekspresji BMI-1 w tych komórkach zwiększało ich radiowrażliwość poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M, hamowało naprawę DNA, wpływało na wzrost ekspresji p16, p14 (ang. *protein 14*), p53 oraz apoptozę tych komórek (263).

W komórkach macierzystych raka piersi (BCSC, ang. *breast cancer stem cells*) wykazano, że po zwiększeniu ekspresji miR-494-3p istotnie dochodziło do obniżenia ekspresji BMI-1 co wpływało na zahamowanie samoodnowy komórek (34). Podobny efekt zaobserwowano w przypadku miR-218, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-15a (106, 177, 271). miR-181a obniżał ekspresję BMI-1 w macierzystych komórkach glejaka (GSCs, ang. *glioblastoma stem-like cells*) a przez to wpływał na zahamowanie formowania sfer, promował apoptozę oraz zmniejszał potencjał rakotwórczy komórek (91).

3.2. Zmiany ekspresji BMI-1 w komórkach nowotworowych

BMI-1 wchodzące w skład kompleksu represyjnego PRC1 odgrywa istotną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak naprawa DNA, wzrost, proliferacja, starzenie czy apoptoza. Zaburzenia w ekspresji i aktywności BMI-1 mogą istotnie wpływać na dysregulację tych procesów w komórkach nowotworowych (200).

Nadekspresja BMI-1 występująca w wielu nowotworach sprzyja wzrostowi i proliferacji komórek, ale również wpływa na ich zdolność do metastazy, inwazji, angiogenezy i chemiooporności. Jednak w przypadku nowotworu endometrium i płuc raczej spadek ekspresji BMI-1 związany jest ze wzrostem inwazyjności tych nowotworów (59, 258).

BMI-1 jako onkogen wpływa na indukcję transformacji nowotworowej oraz promuje rozwój guza w modelach zwierzęcych, lecz współdziałając z innymi czynnikami (26). Udowodniono, że Bmi-1 i c-Myc indukują chłoniaka w modelu mysim (86). Badania Hoenerhoff i wsp., wykazały, że nadekspresja BMI-1 w nienowotworowych komórkach piersi MCF10A nie wywołuje u nich transformacji nowotworowej, lecz koekspresja z H-RAS (ang. *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) sprzyja temu procesowi (93). Komórki z koekspresją BMI-1 i H-RAS mają zwiększoną proliferację oraz oporność na indukcję apoptozy. Ponadto komórki te mają zdolność do indukowania nowotworów u myszy. Nowotwory wywodzące się z komórek z nadekspesją BMI-1 wykazują zdolność do tworzenia przerzutów do mózgu (93).

Zmniejszenie ekspresji *BMII* zarówno po użyciu shRNA jak i inhibitora hamuje proliferację komórek raka piersi *in vitro* oraz wzrost guza *in vitro* w modelu zwierzęcym (206). Podobnie, w komórkach raka głowy i szyi zmniejszenie ekspresji *BMII* inhibitorem PTC-209 powoduje zahamowanie ich proliferacji, a także zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1, obniżenie potencjału do inwazji i metastazy oraz wzrost apoptozy komórek. Ponadto komórki te były wrażliwe na traktowanie cisplatyną. Natomiast podawanie inhibitora BMI-1, PTC-209 (ang. *N-(2,6-Dibromo-4-methoxyphenyl)-4-(2-methylimidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)-2thiazolamine*) zmniejszało wzrost guza w ksenograficznym modelu ludzkiego raka głowy i szyi (236). Wzrost ekspresji BMI-1 w raku jajnika wpływa na obniżenie poziomu p16^{INK4A}, a przez to wzrost proliferacji komórek oraz zmniejsza szybkość apoptozy tych komórek (4).

BMI-1 odgrywa istotną rolę w promowaniu procesu angiogenezy nowotworów. W badaniach z wykorzystaniem błony kosmówkowo-owodniowej kurzych zarodków (CAM, ang. *chorioallatonic membrane*) wykazano, że nadekspresja BMI-1 wzmacnia, a wyciszenie *BMII* hamuje zdolność komórek glejaka do tworzenia tubul w przeprowadzonym *in vitro*

teście na matrygelu oraz migrację komórek endotelialnych i neowaskularyzację. Podobnie nadekspresja BMI-1 indukuje angiogenezę *in vitro* w ksenograftach ludzkiego glejaka. Sugeruje się, że BMI-1 indukuje angiogenezę poprzez zwiększenie ekspresji czynnika NF-kappaB, który wpływa na wzrost ekspresji czynnika wzrostu naczyniowo-śródbłonkowego VEGF-C (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor C*) (104).

Oporność na chemioterapię jest jednym z głównych problemów leczenia nowotworów. Konsekwencją chemiooporności są przerzuty i nawrót choroby. Istotną rolę w oporności na chemioterapię może odgrywać przejście epitelialno-mezenchymalne. Sugeruje się, że w komórkach raka języka zmniejszona ekspresja miR-200b oraz miR-15b wpływa na wzrost ekspresji *BMI1*, w wyniku czego dochodzi do wzrostu EMT, które wpływa na chemiooporność tych komórek (209). Podobną zależność w przypadku miR-194 oraz BMI-1 zaobserwowali Dong i wsp. (2011) (54) w przypadku raka endometrium. Zhou i wsp. (2015) (288) wykazali, że PODXL (ang. *Podocalyxin-like protein 1*) zwiększa chemiooporność oraz zmniejsza stopień apoptozy po traktowaniu cisplatyną linii komórkowych płaskonabłonkowego raka języka poprzez wzrost ekspresji BMI-1. Badania Shahi i wsp. (2016) (238) sugerują, że BMI-1 w komórkach glejaka wpływa na podwyższenie ekspresji MRP1 (ang. *multi-drug resistance protein 1*) promując chemiooporność komórek (197). W komórkach płaskonabłonkowego raka przełyku równoczesna inhibicja BMI-1 i Me118 wpływała na chemiowrażliwość komórek w większym stopniu niż zahamowanie ekspresji BMI-1 poprzez indukcję apoptozy tych komórek (238).

Wyciszenie ekspresji *BMI1* przez shRNA redukowało oporność na chemioterapeutyki i zdolność do inwazji komórki raka trzustki. W wyniku zahamowania *BMI1* w tych komórkach dochodziło do zahamowania szlaku PI3K/AKT, lecz zwiększało zdolność tych komórek do tworzenia sferoid w hodowlach *in vitro* (275). W komórkach raka jamy nosowo-gardłowej BMI-1 promuje przejście epitelialno-mezenchymalne hamując ekspresję *PTEN* i aktywując szlak PI3K/AKT/GSK-3 β oraz stabilizację czynnika transkrypcyjnego SNAIL1. Czynniki ten razem z kompleksem PRC1 przyłącza się do promotora genu dla E-kadheryny i obniżając jego ekspresję przyczynia się do obniżenia zdolności komórek raka jamy nosowo-gardłowej do adhezji oraz inwazyjności (203). Nadekspresja BMI-1 w komórkach glejaka wpływa na wzrost migracji i inwazji tych komórek poprzez aktywację czynnika NF- κ B, który wpływa na zwiększenie ekspresji genów dla metaloproteinaz *MMP9* i *MMP3* (104).

Wysoka ekspresja BMI-1 koreluje z obniżonym czasem przeżycia u pacjentów chorujących na glejaki (130, 158), rdzeniaki (87, 133), raka jamy nosowo-gardłowej (203), raka wątroby (57, 131), prostaty (222), jajnika (4, 80), trzustki (204, 235), białaczki (195).

Nowotwory piersi mają skłonność do nawrotów wiele lat po zakończonej terapii. Wyższą ekspresję BMI-1 obserwuje się we wczesnych oraz późnych przerzutach raka piersi w stosunku do pierwotnych ognisk nowotworu. Bardzo wysoką ekspresję zaobserwowano u pacjentek, u których stwierdzono późne nawroty nowotworu (109). W nowotworach pęcherza ekspresja BMI-1 jest skorelowana z klasyfikacją guza, nawrotem nowotworu, stadium TNM oraz rokowaniem. Pacjenci z nadekspresją BMI-1 wykazywali krótszy czas przeżycia niż pacjenci z obniżoną ekspresją BMI-1 (185). Natomiast zmniejszenie ekspresji BMI-1 w komórkach raka płuc wpływa na wzrost inwazji i metastazy komórek. Wzrost BMI-1 zaobserwowano we wczesnym stadium raka płuc, a spadek w późnym stadium nowotworu płuc (257).

3.3. BMI-1, potencjalny cel terapii antynowotworowych

BMI-1 stał się potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych, ponieważ wpływa na komórki macierzyste, ma zdolność do indukowania nowotworów u myszy, a także wpływ na progresję nowotworów (26). W związku z tym, poszukuje się związków, które mogą istotnie wpływać na jego ekspresję. Do takich związków możemy zaliczyć artemizynę, salinomycynę, Erismodegib (NVP-LDE-225), inhibitory deacetylaz histonów, PTC-209, PTC-028, PTC-596 (ang. *5-fluoro-2-(6-fluoro-2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-N4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrimidine-4,6-diamine*) (**Ryc.5**).

Artemizyna jest związkiem, który jest powszechnie używany w leczeniu malarii, głównie szczepów opornych na leki. Ze względu na swoją hydrofobową strukturę, artemizyna może przenikać przez błony komórkowe. Ponadto, związek ten wykazuje aktywność przeciwnowotworową, poprzez uwrażliwienie komórek na zastosowane leczenie. Artemizyna hamuje również ekspresję BMI-1 na poziomie mRNA i białka, przez co może w przyszłości być zastosowana w leczeniu nowotworów, w których obserwuje się nadekspresję BMI-1 (95, 117, 280). Komórki z wyciszoną ekspresją *BMI1* wykazują wyższą wrażliwość na artemizynę, czego wynikiem jest nasilenie ekspresji p16 oraz zahamowanie ekspresji CDK4 i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 (250).

Salinomycyna to monokarboksylowy antybiotyk polieteryowy, który wykazuje aktywność antynowotworową w przypadku raka piersi, płuc czy okrężnicy. Aktywność ta wynika, z tego, że związek ten wpływa na indukcję apoptozy oraz hamuje proliferację oraz inwazję komórek, a także ekspresję markerów komórek macierzystych. Salinomycyna zahamowuje ekspresję BMI-1 w komórkach macierzystych raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, obniżając

zdolność komórek do samoodnowy, a także w warunkach *in vitro* ich zdolność do tworzenia sferoid (123).

NVP-LDE-225 jest inhibitorem białka smoothed, wchodzącego w skład receptora błonowego, który oddziałuje z białkiem Sonic Hedgehog. Nanta i wsp. (2013) (169) wykazali, że NVP-LDE-225 w komórkach macierzystych stercza indukował ekspresję miR-128, który wpływał na spadek ekspresji BMI-1.

Ekspresję BMI-1 oraz poziom ubikwitynylacji lizyny 119 histonu H2A w komórkach raka piersi oraz ludzkich multipotencjalnych komórek macierzystych mogą również obniżać inhibitory deacetylaz histonowych (21, 110). Jedne z najczęściej stosowanych inhibitorów tj. maślan sodu i panobinostat zwiększając ekspresję miR-31 w komórkach nowotworu piersi prowadzą do spadku ekspresji BMI-1 oraz indukują proces starzenia (40). Inhibitor deacetylaz SAHA (ang. *Suberoylanilide Hydroxamic Acid*) hamując ekspresję BMI-1 wpływa na zahamowanie cech komórek macierzystych glejaka (96).

Na ekspresję białka BMI-1 wpływają również naturalnie występujące związki jak kurkumina, eodyna oraz 1,6,7-trihydroksyksanton. Wykazano, że w komórkach raka piersi jednoczesne traktowanie kurkumina i eodyną wpływało na wzrost ekspresji miR-34a, które hamowało ekspresję *BMII* oraz *BCL2* (83). Podobnie w komórkach raka wątroby 1,6,7-trihydroksyksanton wpływał na wzrost ekspresji miR-218, który hamował ekspresję *BMII* (66).

Istotną rolę w hamowaniu ekspresji BMI-1 odgrywają selektywne niskocząsteczkowe inhibitory takie jak PTC-028, PTC-209 czy PTC-596.

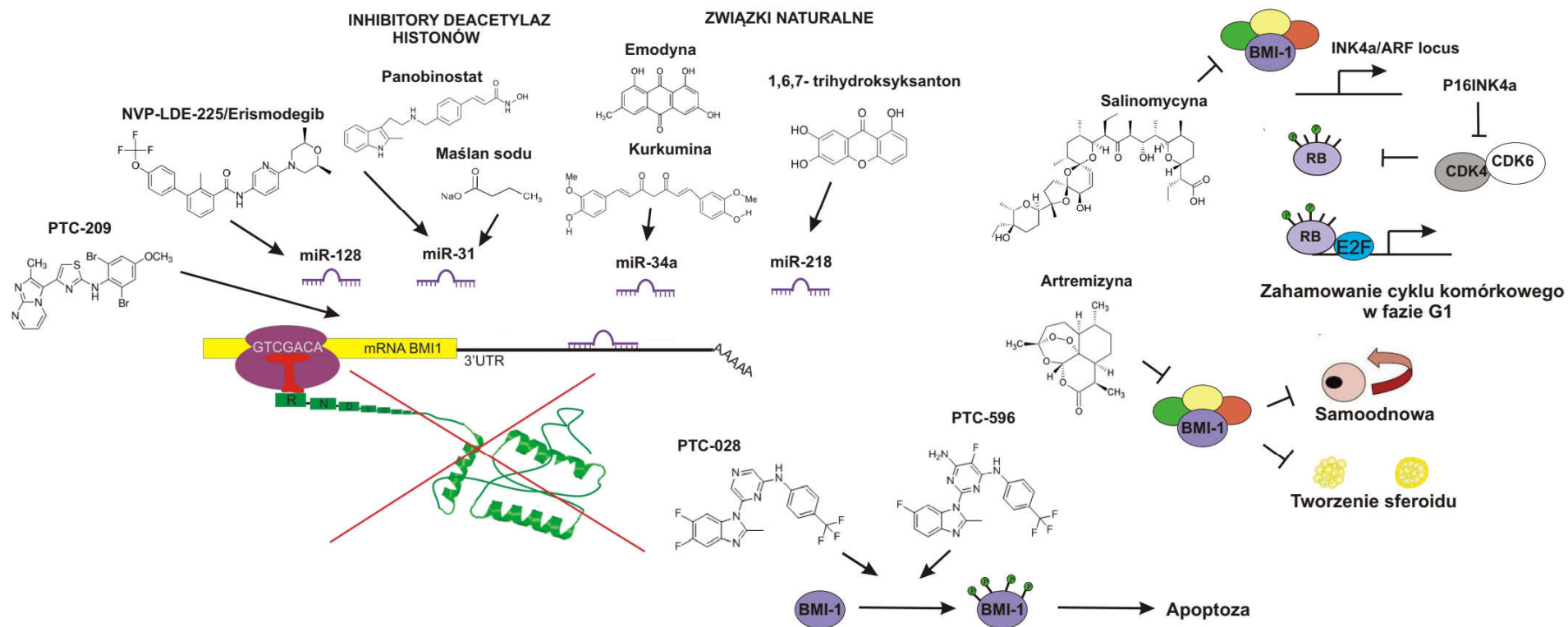
PTC-028 to inhibitor BMI-1, który hamuje ekspresję BMI-1 poprzez jego fosforylację przez co wpływa na zmniejszenie ilości ATP w komórkach, zaburza równowagę redoks w mitochondriach co nasila apoptozę zależną od kaspaz. W komórkach nowotworowych związek ten selektywnie hamuje ich klonalny wzrost, a także żywotność komórek (50). W mysim modelu raka jajnika zastosowanie PTC-028 wykazuje aktywność przeciwnowotworową porównywalną ze standardową terapią cisplatyną lub paklitakselem (50).

PTC-209 to inhibitor BMI-1, który hamuje jego ekspresję na poziomie translacji poprzez przyłączenie się do regionu 3' UTR mRNA w komórkach linii raka jelita grubego HCT116. PTC-209 zmniejsza wzrost komórek jelita grubego oraz eliminuje komórki inicjujące nowotwór zarówno w *in vitro* i *in vivo* (121). Zastosowanie PTC-209 w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi powodowało nieodwracalne zatrzymanie progresji tego nowotworu (236). PTC-209 w sposób zależny od dawki zmniejsza żywotność komórek linii

komórkowej raka błony dróg żółciowych, co w konsekwencji prowadzi do zatrzymania proliferacji komórek. Ponadto, zaobserwowano, że mimo zahamowania ekspresji BMI-1 na poziomie białka w tej linii dochodziło do wzrostu ekspresji na poziomie mRNA, co może być związane z efektem kompensacji (165).

PTC-597 podobnie jak PTC-028 wpływa na zahamowanie ekspresji białka BMI-1 poprzez jego fosforylację. PTC-596 w progenitorowych komórkach ostrej białaczki szpikowej obniżał ekspresję MCL-1 oraz indukował apoptozę niezależnie od p53 (172). Podobne rezultaty zaobserwowano w liniach komórkowych chłoniaka. Pozytywnie ukończono pierwszą fazę badań klinicznych nad PTC-596 u pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi (NCT02404480). Obecnie związek ten jest w drugiej fazie badań klinicznych (159).

Inhibitory białka BMI-1 poprzez obniżanie jego ekspresji zarówno w komórkach nowotworowych oraz nowotworowych komórkach macierzystych mogą w przyszłości w połączeniu z klasycznymi terapiami przeciwnowotworowymi zapewniać lepsze rezultaty leczenia (26).



Rycina 5. Mechanizmy działania inhibitorów BMI-1. Istnieje kilka terapeutyków, które wpływają pośrednio na ekspresję BMI-1 poprzez regulację specyficznych mikroRNA tj. NVP-LDE-225/Erismodegib, inhibitory deacetylaz histonów oraz naturalnie występujące związki (kurkumina, eodyna, 1,6,7 trihydroksyksantan, salinomycyna, artemizyna). Na bezpośrednie zahamowanie ekspresji BMI-1 poprzez przyłączenie się do regionu 3'UTR mRNA wpływa PTC-209, a PTC-028 i PTC-596 hamują ekspresję BMI-1 oraz poprzez jego defosforylację .

4. Cel badań

Białko BMI-1 może regulować szlak AKT, chociaż mechanizm tej regulacji nie jest całkowicie poznany (280). Sugeruje się, że w niektórych typach nowotworów BMI-1 przyłączając się do regionu promotorowego genu *PTEN* i hamując jego ekspresję, wpływa na aktywację szlaku kinazy AKT, co prowadzi do wzrostu proliferacji komórek nowotworowych, a także potencjału migracyjnego i inwazyjnego nowotworów (203, 235). Nieznany jest jednak wpływ BMI-1 na szlak AKT w komórkach nie wykazujących ekspresji *PTEN*. Ponadto w przypadku niektórych nowotworów badania kliniczne wykazały, że brak lub niska ekspresja BMI-1 jest charakterystyczna dla nowotworów o wyższym stopniu zaawansowania. Engelsen i wsp. (2008) (59) wykazali, że niska ekspresja BMI-1 w raku endometrium jest skorelowana z utratą receptora estrogenowego, przerzutowaniem oraz wiąże się ze złymi rokowaniami dla pacjentek (59). Dane literaturowe odnośnie roli białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w raku endometrium są więc niejednoznaczne. Ponadto dane epidemiologiczne wskazują, że otyłość i zwiększone stężenie insuliny we krwi wynikające z insulinooporności są poważnymi czynnikami ryzyka wielu nowotworów w tym nowotworów endometrium. Ostatnie badania sugerują, że białko BMI-1 może mieć istotny związek z insulinoopornością i regulacją szlaku insuliny. Cannon i wsp. (2014) (25) stwierdzili istnienie negatywnej korelacji pomiędzy poziomem BMI-1 a wrażliwością na insulinę w komórkach wątroby myszy (25). Dlatego istotnym wydaje się określenie zależnego od stężenia glukozy i insuliny związku pomiędzy BMI-1 a szlakiem kinazy AKT w komórkach nowotworowych.

W związku z tym głównym celem przeprowadzonych w niniejszej pracy badań było określenie roli białka BMI-1 w regulacji szlaku kinazy AKT w warunkach hipo- i hiperglikemii w raku endometrium oraz jego wpływu na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek. W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe raka endometrium (HEC-1A oraz Ishikawa) różniące się ekspresją białka *PTEN* oraz materiał kliniczny obejmujący preparaty tkanki prawidłowej endometrium oraz preparaty raka błony śluzowej trzonu macicy.

Cele szczegółowe przeprowadzonych badań obejmowały:

- 1) określenie wpływu wyciszenia lub zahamowania ekspresji BMI-1 na fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję fosfataz zaangażowanych w regulację jej aktywności (*PTEN*, *PP2A*, *PHLPP1*, *PHLPP2*);

- 2) określenie wpływu stymulacji insuliną na zależną od BMI-1 fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję genów *PTEN* i *PHLPP1/2* w komórkach raka błony śluzowej macicy w warunkach hipo- i hiperglikemii;
- 3) określenie wpływu zahamowania ekspresji BMI-1 na żywotność i proliferację komórek w warunkach hipo- lub hiperglikemii;
- 4) określenie wpływu zahamowania BMI-1 na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek raka endometrium oraz ekspresję genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne (*SNAIL*, *SLUG*, *ZEB1*, *TWIST*, *CDH1*);
- 5) analizę porównawczą ekspresji BMI-1, *PTEN*, *AKT*, *PHLPP1*, *PHLPP2* oraz poziomu fosforylacji kinazy *AKT* w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy oraz w zależności od parametrów kliniczno-patologicznych;
- 7) analizę korelacji pomiędzy ekspresją BMI-1, *PTEN* oraz fosforylacją kinazy *AKT*, a także ekspresją genów *PHLPP1* oraz *PHLPP2* w preparatach raka endometrium.

5. Materiał

5.1. Materiał kliniczny

Materiał wykorzystany do badań stanowiło 37 preparatów tkanki prawidłowej endometrium oraz 93 preparaty raka błony śluzowej trzonu macicy, którego charakterystyka kliniczno-patologiczna została przedstawiona w **Tabeli 1**. Materiał kliniczny pochodził od pacjentek przebywających na Oddziale Klinicznym Ginekologii Onkologicznej Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi. Został on uzyskany dzięki współpracy z prof. dr hab. Andrzejem Bieńkiewiczem.

Badania przeprowadzone w pracy doktorskiej uzyskały pozytywną opinię Komisji ds. Bioetyki Badań Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego (UCHWAŁA NR18/KBBN-UŁ/I/2017).

Tabela 1. Charakterystyka kliniczno-patologiczna preparatów raka błony śluzowej trzonu macicy.

Charakterystyka materiału	Liczba przypadków
Tkanka prawidłowa endometrium	37
Preparaty nowotworów endometrium	93
Stopień zaawansowania wg klasyfikacji FIGO	
I	51
II	19
III+IV	23
Stopień histologicznej złośliwości	
G1	17
G2	52
G3	24
Stopień naciekania mięśniówki	
<1/2	41
≥1/2	52
Zajęcie węzłów chłonnych	
Nie	77
Tak	16

5.2. Linie komórkowe raka błony śluzowej raka trzonu macicy

W badaniach wykorzystano dwie linie raka błony śluzowej trzonu macicy HEC-1A oraz Ishikawa. Linie komórkową HEC-1A zakupiono w ATCC (*ang. American Type Culture Collection*), a linię Ishikawa w ECACC (*ang. European Collection of Authenticated Cell Cultures*).

Charakterystyka linii komórkowych:

HEC-1A- linia komórkowa, która pochodzi z gruczolaka 71-letniej pacjentki z nowotworem o średniozaawansowanym stopniu histologicznej złośliwości (G2). Linia komórkowa HEC-1A w warunkach *in vivo* formuje dobrze zróżnicowanego gruczolaka endometrium, który znajduje się w II stopniu zaawansowania klinicznego. Linia ta charakteryzuje się również ekspresją czynnika aktywującego płytki krwi (PAF, ang. *platelet-activating factor*) oraz ekspresją fosfatazy PTEN. Ekspresja PAF w linii HEC-1A wpływa na ekspresję czynnika c-fos.

Ishikawa- linia komórkowa pochodząca z gruczolaka 39-letniej pacjentki. Komórki tej linii u atymicznych nagich myszy indukują dobrze zróżnicowanego gruczolaka. Wykazano, że linia Ishikawa zarówno w hodowli komórkowej i nowotworach indukowanych charakteryzuje się ekspresją receptora progesteronowego (PR, ang. *progesterone receptor*) oraz estrogenowego (ER, ang. *estrogen receptor*). Ponadto, komórki tej linii wytwarzają gonadotropinę kosmówkową (CG, ang. *chorionic gonadotropin*), hormon uwalniający kortykotropinę (CRH, ang. *corticotropin-releasing hormone*) oraz łożyskową fosfatazę alkaliczną. Linia ta nie wykazuje ekspresji białka PTEN ze względu na mutację występującą w tym genie.

6. Metody

6.1. Hodowla komórek

Hodowle komórek raka błony śluzowej trzony macicy HEC-1A oraz Ishikawa prowadzono w warunkach standardowych (37°C, wilgotności 95%, w atmosferze wzbogaconej w 5% CO₂) oraz z podłożu DMEM:F12 (Biowest, Francja), które zawierało 2 mM L-glutaminę, 15 mM HEPES oraz 10% płodowa surowicę bydlęcą (FBS, *ang. fetal bovine serum*) (Biowest, Francja) w przypadku linii komórkowej HEC-1A oraz 5 % FBS w przypadku linii komórkowej Ishikawa. Podłoże hodowlane zmieniano w butelkach hodowlanych co 2 dni. Komórki obu linii komórkowych pasażowano co 4-5 dni w stosunku 1:8, a trypsynizowano przy użyciu roztworu 0,25% trypsyny z 0,02% EDTA (Biowest, Francja).

W zależności od analizy, komórki wysiewano na 6-, 12-, 24-, lub 96- dołkowe płytki na 24 godziny przed planowanym eksperymentem. Liczbę komórek wysianych na poszczególne płytki hodowlane przedstawia **Tabela 2**.

Tabela 2. Liczba komórek wysianych na poszczególne płytki hodowlane.

Lp.	Rodzaj zastosowanego naczynia hodowlanego	Liczba komórek (ilość komórek na dołek)	
		HEC-1A	Ishikawa
1.	Płytko hodowlana 6-dołkowa	400 000	300 000
2.	Płytko hodowlana 12-dołkowa	200 000	150 000
3.	Płytko hodowlana 24-dołkowa	100 000	75 000
4.	Płytko hodowlana 96-dołkowa	8 000	6 000

6.2. Zmniejszenie ekspresji BMI-1 metodą interferencji RNA oraz przez zastosowanie PTC-209

Ekspresję genu *BMI1* wyciszono przy użyciu Silencer[®] Select siRNA firmy Ambion[®] (ID: s2016) (U.S.A.). Kontrolę stanowił Silencer[®] Select Negativ Control #1 siRNA o sekwencji niehomologicznej do genów człowieka (Ambion[®], U.S.A.).

Transfekcja komórek została przeprowadzona przy użyciu odczynnika Lipofectamine[™] RNAiMAX (Invitrogen[™], U.S.A.) zgodnie z zaleceniami producenta zawartymi w protokole. Przygotowano dwie próbki, z których każda zawierało po 100 µl medium Opti-MEM (Gibco[®], U.S.A.) ze zredukowaną zawartością surowicy. Do pierwszej został dodany

odczynnik Lipofectamine™, a do drugiej 30 nM siRNA, a następnie po 5-minutowej inkubacji próbkę zawierającą siRNA przenoszono do próbki zawierającej odczynnik do transfekcji. Całość delikatnie mieszano, inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie powstały kompleks dodawano do dołka z komórkami. Komórkom po 24 godzinach od transfekcji zmieniano podłoże. Efekt interferencji na poziomie mRNA i białka w przypadku obu linii komórkowych badano po 48 h.

Translacja białka BMI-1 została zahamowana przy użyciu PTC-209 (ang. *N*-(2,6-dibromo-4-methoxyphenyl)-4-(2-methylimidazo[1,2-a]pyrimidin-3-yl)-2-thiazolamine). Komórki obu linii wysiewano na płytki hodowlane 6-dołkowe w gęstości podanej w **Tabeli 2**. We wszystkich eksperymentach traktowano komórki PTC-209 w stężeniu 5 μM, które wybrano na podstawie wcześniejszych badań, wskazujących na najlepszy efekt hamowania ekspresji BMI-1. Efekt działania BMI-1 na poziomie mRNA oceniano po 48 godzinach, a na poziomie białka po 48 lub 72 godzinach.

6.3. Traktowanie komórek

Komórki HEC-1A oraz Ishikawa wysiewano na 12-dokowe płytki hodowlane o gęstości podanej w **Tabeli 2**, a następnie traktowano PTC-209 (MedChemTronica) w warunkach hipoglikemii (0,5 mM glukoza) oraz w warunkach hiperglikemii (30 mM glukoza). Efekt zarówno na poziomie mRNA i białka oceniano po 48 godzinach.

Komórki obu linii komórkowych wysiewano również na płytkę 12-dołkową, a następnego dnia na płytach zmieniano medium na medium bez surowicy o odpowiednim stężeniu glukozy 0,5 mM (warunki hipoglikemii) lub 30 mM (warunki hiperglikemii) w obecności lub braku inhibitora PTC-209 (5 μM, MedChem Tronica). Po upływie 24 godzin komórki stymulowano insuliną w warunkach hipo- lub hiperglikemii, a następnie zbierano po 2, 4, 6, 8 godzinach od momentu stymulacji insuliną.

6.4. Izolowanie RNA

Izolację RNA zarówno z tkanek jak i badanych komórek przeprowadzono przy użyciu zestawu EXTRACTME TOTAL RNA firmy DNA Gdańsk (Polska).

Osad komórek zawieszano w 600 μl buforu lizującego RLys, który zawierał 1% 2-merkaptoetanol. Próbki intensywnie worteksomano, a następnie wirowano przy 15 000 x g przez 2 minuty. Uzyskany supernatant nanoszono na minikolumnę homogenizacyjną H znajdującą się w próbówce odbierającej i wirowano przez 2 minuty przy

15 000 x g. Otrzymany przesącz mieszano z 600 μ l 96 % etanolu, a następnie przenoszono na umieszczoną w próbówce odbierającej minikolumnę wiążącą B i wirowano przez 1 minutę przy 15 000 x g. Minikolumnę płukano trzykrotnie z wykorzystaniem buforów RW1 i RW2. Następnie minikolumny umieszczano w próbkach typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml i na środek każdej z nich dodawano 20 μ l buforu elucyjnego REB, inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 2 minuty przy 11 000 x g. Wyizolowane RNA umieszczano w temperaturze -20°C.

6.5. Spektrofotometryczna analiza czystości RNA

Na ocenę czystości wyizolowanego RNA pozwala metoda spektrofotometryczna poprzez pomiar absorbancji próbek przy długościach fal 260 nm i 280 nm. Jako wzór czystości wyizolowanego RNA uznaje się wartość A_{260}/A_{280} , która mieści się w granicach 1,8-2,0. Stężenie RNA poszczególnych prób, określono przy pomocy wartości absorbancji przy długości fali 260 nm, przy użyciu następującej zależności:

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

wartość 40 μ g/ml to stężenie jednoniciowego RNA, które odpowiada absorbancji jednostkowej przy długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm.

6.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcja odwrotnej transkrypcji została wykonana zestawem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta. 2 μ g RNA zawieszano w 10 μ l wody wolnej od RNAz i dodawano 2 μ l buforu reakcyjnego (10x RT Bufor), 2 μ l starterów losowych (10x RT Random Primers), 0,8 μ l deoksyrybonukleotydów dNTP (100 mM), 1 μ l odwrotnej transkryptazy (MultiScribe Reverse Transcriptase) i 4,2 μ l wody wolnej od RNAz. 20 μ l uzyskanej mieszaniny inkubowano w temperaturze 25°C przez 10 minut, w 37°C przez 120 minut oraz w 85°C przez 5 minut. Uzyskane 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 przy pomocy testu TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems, U.S.A.), zawierającego komercyjnie dostępne zestawy nieznakowanych specyficznych starterów oraz sond TaqMan[®] MGB znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym FAM[™]. Użyte zestawy przedstawiono w **Tabeli 3**. Mieszanina reakcyjna składała się z 1 µl cDNA, 0,5 µl sond TaqMan[®] (20x TaqMan[®] Gene Expression Assays, Applied Biosystems, USA), 3,5 µl wody oraz 5 µl buforu reakcyjnego (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix: polimeraza TaqMan[®], dNTP, bufor reakcyjny, Applied Biosystem, USA). Profil termiczny obejmował wstępną denaturację w temperaturze 95°C przez 10 minut, oraz 40 cykli obejmujących inkubację w temperaturze 95°C przez 15 s, a także inkubację w temperaturze 60°C przez 1 minutę.

Ekspresję poszczególnych genów analizowano również przy pomocy reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystując odpowiednio zaprojektowane startery (**Tabela 4**). W tym przypadku w skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 1 µl cDNA, 2 µl buforu reakcyjnego (5x HOT FIREPol[®]Eva Green[®] qPCR Mix Plus (ROX)), 0,25 µl startera F (Forward Primer), 0,25 µl startera R (Reverse Primer), 6,5 µl wody. Profil termiczny obejmował denaturację wstępną w temperaturze 95°C przez 12 minut oraz 40 cykli obejmujących inkubację w temperaturze 95°C przez 15 sekund, 61 °C przez 20 sekund i 72 °C przez 20 sekund.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono 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* według następującej zależności:

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

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

gdzie L to liczba kopii mRNA badanego genu/1000 kopii mRNA genu referencyjnego

Tabela 3. Nazwy badanych genów wraz z numerami identyfikacyjnymi poszczególnych zestawów sond.

Nazwa genu	Sonda TaqMan®
<i>PP2A</i>	Hs00603515_m1
<i>PHLPP1</i>	Hs01597871_m1
<i>PHLPP2</i>	Hs00982295_m1
<i>HPRT1</i>	Hs02800695_m1
<i>BMI1</i>	Hs00180411_m1

Tabela 4. Nazwy badanych genów wraz z sekwencjami odpowiednio zaprojektowanych starterów.

Nazwa genu	Sekwencje starterów
<i>BMI1</i>	F: AATTAGTTCCAGGGCTTTTCAA R: CTTCATCTGCAACCTCTCCTCTAT
<i>PTEN</i>	F: ACAGCCATCATCAAAGAGATCGT R: TGCTTTGAATCCAAAAACCTTACTA
<i>HPRT1</i>	F: CCCTGGCGTCGTGATTAGTG R: ACACCCTTTCCAAATCCTCAGC
<i>PHLPP1</i>	F: AAACCTCACAGCACGGGTAG R: AGGCAGGTCCCACATAGGAT
<i>PHLPP2</i>	F: TCCTGACCTCGGCTGTATGA R: GGGTCTTTCCCTTGCGTACA
<i>SNAIL</i>	F: TGTC AACAGTACCACTGCCA R: CCGGACTCTTGGTGCTTGTG
<i>SLUG</i>	F: AGAGCATTTCAGACAGGTCA R: CTACACAGCAGCCAGATTCCT
<i>ZEB1</i>	F: AAAGATGATGAATGCGAGTC R: TCCATTTTCATCATGACCAC
<i>TWIST</i>	F: CTAGATGTCATTGTTTCCAGAG R: CCCTGTTTCTTTGAATTTGG
<i>CDH1</i>	F: TACATCTCCCTTCACAGC R: ATAGATTCTTGGGTTGGGTC

6.8. Otrzymywanie lizatu komórkowego

Preparaty tkankowe i komórkowe lizowano w buforze 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), a następnie homogenizowano przez 30 s na lodzie za pomocą sonikatora (Vibra CellTM model VCX-130, USA). Po 30 minutowej inkubacji na lodzie, próbki wirowano przy 5000 obr/min (wirówka SorvallTM model ST16R, USA) przez 5 minut w temperaturze 4°C. Uzyskane supernatanty przenoszono do nowych próbek typu Eppendorf, a następnie przechowywano w temperaturze -20 °C.

6.9. Western blotting

6.9.1. Elektroforeza

Lizaty komórkowe i tkankowe mieszano w stosunku 2:1 z 0,9 objętościami buforu do rozpuszczania próbek (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glicerol, 8% SDS, pironina) oraz 0,1 objętości 2-merkaptoetanolu. Próbki denaturowano przez 5 minut w 100°C, schładzano, a następnie nanoszono na żel.

Rozdział elektroforetyczny próbek przeprowadzono metodą Laemmliego (1970) w 8% żelu poliakrylamidowym (375 mM Tris-HCl o pH 8,8 oraz 20% SDS) w płytkach o wymiarach (100 x100 x 2 mm) (125). Próbki zatężono w 3 % żelu zatężającym (125 mM Tris-HCl pH 6,8 oraz 20% SDS). Elektroforetyczny rozdział próbek przeprowadzono w układzie: 192 mM glicyna, 0,1% SDS, 25 mM Tris (pH 8,3). Rozdział elektroforetyczny w żelu zatężającym przebiegał przy natężeniu prądu 25mA na pytkę. Po wejściu białek w żel rozdzielający zwiększono natężenie prądu do 35 mA na płytkę. Czas rozdziału elektroforetycznego trwał około 2 godzin.

6.9.2. Transfer białek na membranę Immobilonu-P

Zgodnie z metodą Towbina i wsp. (1979) białka, które uległy rozdzielaniu w żelu poliakrylamidowym przenoszono elektroforetycznie na membranę Immobilonu-P (o średnicy porów 0,45 µm) (219). Elektrotransfer został przeprowadzony w buforze o składzie 192 mM glicyna, 20% metanol, 25 mM Tris (pH 8,3) w warunkach 4 °C przy stałym napięciu 60 V przez około 16 godzin.

Unieruchomione na membranie Immobilonu-P białka barwiono w 0,2 % roztworze Ponceau S w 3% kwasie octowym w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po odpłukaniu nadmiaru

barwnika wodą zaobserwowano wyraźne pasma białek, które umożliwiły kontrolę elektrotransferu. Pasma białek odbarwiono w roztworze TBST 0,05 M Tris HCl – 0,15M NaCl – 0,01% Tween 20, pH 7,5 (TBS-0,01% Tween 20).

6.9.3. Immunodetekcja białek

Immunodetekcję białek unieruchomionych na membranie Immobilonu-P przeprowadzono w następujących etapach:

1. ograniczenie niespecyficznego wiązania się przeciwciał do membrany Immobilonu-P poprzez godziną inkubację w roztworze TBS – 0,03% Tween 20 (0,05 M Tris HCl – 0,15M NaCl – 0,03% Tween 20, pH 7,5);
2. dwugodzinna inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi, rozcieńczonymi roztworem TBS - 0,01%–Tween 20; charakterystykę przeciwciał umieszczono w **Tabeli 5**;
3. odpłukanie nadmiaru przeciwciał nie związanych z antygenem poprzez trzykrotne przepłukanie membrany w 10 ml roztworu TBS – 0,01% Tween 20; każde płukanie 10 minut;
4. jednogodzinna inkubacja w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi skompleksowanymi z peroksydazą chrzastki w roztworze TBS-0,01%; charakterystykę przeciwciał umieszczono w **Tabeli 5**;
5. odpłukanie nadmiaru przeciwciał nie związanych z antygenem poprzez sześciokrotne płukanie w 10 ml buforu TBS-0,01% Tween 20; każde płukanie 5 minut;
6. identyfikacja kompleksu antygen-przeciwciała, metodą chemiluminescencji przy użyciu zestawu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher Scientific™, Litwa);
7. utrwalenie chemiluminescencji membrany poprzez zaciemnienie kliszy rentgenowskiej.

Na podstawie Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, (ThermoScientific, Litwa) została określona masa cząsteczkowa badanych białek.

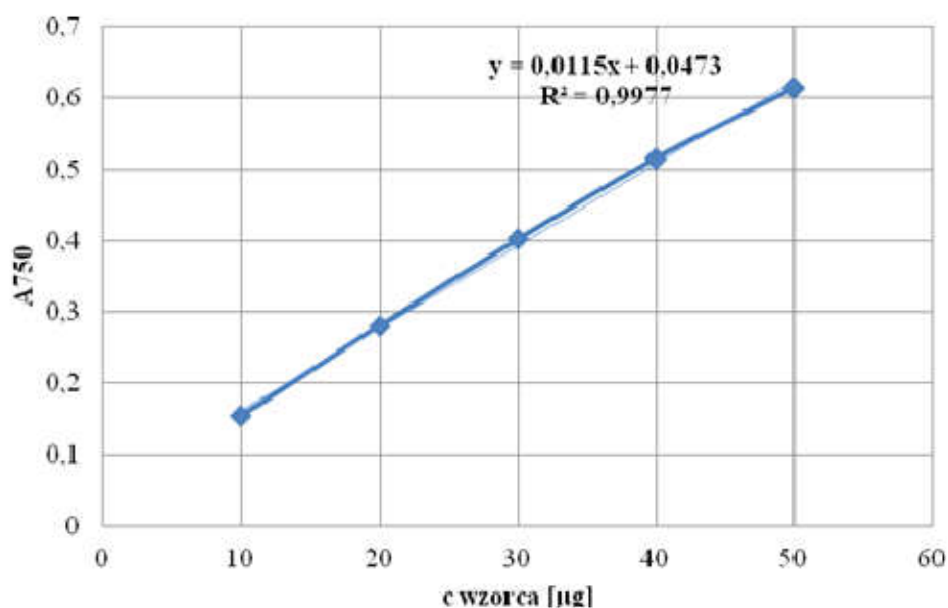
Tabela 5. Charakterystyka przeciwciał wykorzystanych do immunodetekcji.

L.p	Przeciwciała I-rzędowe	Miano	Przeciwciała II-rzędowe	Miano
1	anti-BMI-1 (#6964) królicze przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku BMI-1	1:1000	goat anti-rabbit IgG (#7074) kozie przeciwciała poliklonalne sprzężone z peroksydazą chrzaju skierowane przeciwko IgG królika	1:5000
	Firma: Cell Signaling Technology®		Firma: Cell Signaling Technology®	
2	anti-PTEN (sc-7974) mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku PTEN	1:1000	horse anti-mouse IgG (#7076) końskie przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzaju skierowane przeciwko IgG myszy	1:5000
	Firma: Santa Cruz Biotechnology®		Firma: Cell Signaling Technology®	
3	anti-AKT (sc-5298) mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku AKT	1:1000	horse anti-mouse IgG (#7076) końskie przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzaju skierowane przeciwko IgG myszy	1:5000
	Firma: Santa Cruz Biotechnology®		Firma: Cell Signaling Technology®	
4	anti-phospho-Akt (Ser473) (#9271) królicze przeciwciała poliklonalne klasy IgG skierowane przeciwko białku AKT fosforylowanemu na Ser473	1:1000	goat anti-rabbit IgG (#7074) kozie przeciwciała poliklonalne sprzężone z peroksydazą chrzaju skierowane przeciwko IgG królika	1:5000
	Firma: Cell Signaling Technology®		Firma: Cell Signaling Technology®	
5	anti-β-actin (sc-47778) mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgG skierowane przeciwko β-aktynie	1:1000	horse anti-mouse IgG (#7076) końskie przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzaju skierowane przeciwko IgG myszy	1:5000
	Firma: Santa Cruz Biotechnology®		Firma: Santa Cruz Biotechnology®	

6.10. Analiza ilościowa białka metodą Lowry’ego

Stężenie białka w preparatach tkankowych i komórkowych określono zmodyfikowaną metodą Lowry’ego (154).

Do 5 µl roztworu białka dodano 45 µl wody, a następnie 50 µl 1 M NaOH i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Trzydzieści minut przed dodaniem sporządzono zasadowy roztwór miedzi (2% winian sodowo-potasowy, 1% roztwór CuSO₄, 2% roztwór Na₂CO₃ w stosunku 1:1:1000), który następnie dodano po 1 ml do każdej z próbek. Po 10 minutowej inkubacji dodano rozcieńczonego wodą w stosunku 1:1 odczynnika Folina – Ciocalteu’a, a następnie energicznie mieszano. Próbkę poddano 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, a następnie zmierzono absorbancję w fotokolorymetrze typu Speckol 11 (Carl-Zeiss, Jena) przy długości fali 750 nm. Pomiary dla poszczególnych próbek standaryzowano względem kontroli na odczynniku.



Rycina6. Krzywa wzorcowa do oznaczania zawartości białka.

6.11. Testy na migrację i inwazję

Potencjał komórek HEC-1A oraz Ishikawa do inwazji i migracji po zastosowaniu inhibitora PTC-209 oceniono za pomocą odpowiednich testów. Potencjał migracyjny komórek określono przy pomocy „wound-healing” oraz testu „Transwell”, w którym wykorzystano inserty o odpowiednich wielkościach porów, w przypadku oceny potencjału inwazyjnego komórek inserty dodatkowo opłaszczono Matrigel® Basement Membrane Matrix (Corning).

6.11.1 Test „wound-healing”

Komórki raka błony śluzowej trzonu macicy HEC-1A i Ishikawa wysiewano na płytki 12-dółkowe o gęstości przedstawionej w **Tabeli 2.**, 24 godziny przed planowanym eksperymentem, w celu ich przyklejenia się do powierzchni naczynia hodowlanego. Po tym czasie w każdym z dołków płytki hodowlanej wykonano końcówką na 200 μ l rysę. Komórki, które zostały odklejone podczas wykonywania rysy odpłukano roztworem DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*; Biowest, Francja). Następnie komórki pozostałe na płytce hodowlanej potraktowano 5 μ M inhibitorem PTC-209. Komórki nie traktowane związkiem stanowiły kontrolę. Potencjał migacyjny oceniono na podstawie zmierzonej wielkości rysy za pomocą podziałki mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse TE200 microscope with Zeiss CCD video camera AcioCam ERc5s). Pomiaru wielkości rysy dokonano po 0, 24 i 48 godzinach.

6.11.2. Test „Transwell-assay” i ocena potencjału inwazyjnego komórek przy pomocy Matrigel[®] Basement Membrane Matrix (Corning)

Ocenę potencjału migracyjnego przy pomocy „Transwell assay” oraz potencjału inwazyjnego przy pomocy Matrigel[®] Basement Membrane Matrix (Corning) wykonano z zastosowaniem insertów wielkości porów 8 μ m z membraną z politereftalanu etylenu (PET, ang. *Polyethyleneterephthalate*) (Greiner Bio-One, Niemcy). Komórki potraktowane 5 μ M PTC-209 po 24 godzinach wysiewano w medium bez surowicy, a następnie przenoszono do insertu (5×10^4), który umieszczano w dołkach płytki hodowlanej zawierającej medium z surowicą. Inserty w przypadku oceny inwazji opłaszczano dodatkowo Matrigel[®] Basement Membrane Matrix (Corning). Jako kontrolę użyto komórek nie traktowanych związkiem. Po 24 godzinach inkubacji komórki z górnej komory insertu usuwano, a następnie przepłukiwano dwukrotnie DPBS (ang. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*; Biowest, Francja). Inserty utrwalano w 4% paraformaldehydzie i barwiono barwnikiem Giemsa. W celu oceny potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórki liczone przy użyciu mikroskopu świetlnego (Nikon Eclipse TE200 microscope with Zeiss CCD video camera Acio Cam ERc5s).

6.13. Ocena żywotności i proliferacji komórek testem MTT

W celu oznaczenia żywotności i proliferacji komórek użyto metody MTT (Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowy). Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości odpowiedniej dla danej linii komórkowej. Po 24 godzinach komórki traktowano 5 μ M PTC-209 w warunkach hipoglikemii (0,5 mM glukoza) oraz hiperglikemii (25 mM glukoza) i inkubowano przez 48 godzin. Do każdego dołka płytki dodawano po 50 μ l roztworu soli tetrazolowej (stężenie końcowe 5 mg/ml). Płytkę hodowlaną umieszczono w inkubatorze na 2 godziny. Po zakończeniu inkubacji usuwano medium i dodawano do każdego dołka po 100 μ l dimetylosulfotlenku w celu rozpuszczenia powstałych kryształów formazanu. Po delikatnym wymieszaniu absorbancję roztworu formazanu odczytywano przy długości fali $\lambda=590$ nm. Od każdej absorbancji odejmowano absorbancję kontroli odczynnikowej. Procent żywych komórek wyliczano porównując wartość absorbancji prób badanych z wartością absorbancji kontroli (komórki nietraktowane związkami). Absorbancję kontroli przyjmowano za 1.

6.14. Immunoprecypitacja chromatyny

Komórki wysiewano na płytkę 6-dołkową, a następnego dnia traktowano 5 μ M PTC-209 (MedChem Tronica). Po 48 godzinach od traktowania z każdego z dołków usuwano medium i przepłukiwano DPBS (Biowest, Francja). Następnie do dołków dodawano 1% formaldehyd w DPBS i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 14 minut. Po inkubacji do mieszaniny dodawano 100 μ l 2,5 M glicyny. Mieszaninę usuwano po 4 minutach, a następnie dołki przepłukiwano DPBS. Do komórek dodawano 2 ml buforu lizującego (Lysis Buffer: 10 mM HEPES, 85 mM KCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF), inkubowano 7 minut, przenoszono do nowych próbek i wirowano 900 rpm przez 2 minuty. Supernatant usuwano, a komórki zawieszano w 700 μ l buforu do lizowania o dużej zawartości soli (Lysis Buffer High Salt: 1x DPBS, 1% Triton X-100, 0.5% deoksychołan sodu, 0.1% SDS, 1 mM PMSF), a następnie homogenizowano przez 30 s oraz 10 s na lodzie za pomocą sonikatora (Vibra Cell TM model VCX-130, USA). Po sonifikacji komórki wirowano przy 10 000 rpm przez 10 minut w temperaturze 4°C, po czym supernatant przenoszono do nowych próbek i oznaczano zawartość białka metodą Lowry'ego w celu ustalenia ilości określonych przeciwciał, które mają być dodane. Do nowych próbek przenoszono 650 μ l uzyskanego supernatantu, a następnie z tego przenoszono 10 μ l do nowych próbek (INPUT, całkowita ilość chromatyny). Do próbek z supernatantem dodawano 25 μ l kulek agarozowych

(Protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz Biotechnology) i inkubowano na rotorze przez 30 minut w 4°C w celu oczyszczenia wstępnego. Po inkubacji próbki wirowano przy 5 000 rpm przez 5 minut w temperaturze 4°C, a supernatant przenoszono do nowych próbek. Do uzyskanego supernatantu dodawano przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko białku BMI-1 (#6964; Cell Signaling Technology®) oraz kontrolne normal mouse IgG (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) i inkubowano na rotorze w 4°C przez całą noc. Następnie do próbek dodawano 50 µl kulek agarozowych Protein A/G PLUS-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) i inkubowano na rotorze przez 2 godziny w 4°C. Próbki wirowano przy 12 000 rpm przez 20 s, usuwano supernatant, a kulki agarozowe Protein A/G PLUS-Agarose beads płukano dwukrotnie w 300 µl buforu do lizowania o dużej zawartości soli (Lysis Buffer High Salt), przy czym po każdym płukaniu wirowano przy 12 000 rpm przez 20 s. Kulki agarozowe Protein A/G PLUS-Agarose beads przemywano czterokrotnie w 300 µl buforze do przemywania (Wash Buffer: 100 mM Tris (pH 8), 500 mM LiCl, 1% Triton X-100, 1% deoksycholan) przy czym po każdym przemyciu wirowano przy 12 000 rpm przez 20 s. Osady oraz uzyskaną wcześniej całkowitą ilość chromatyny zawieszano w 300 µl buforu elucyjnego (Elution Buffer: 1% SDS, 0,1 M NaHCO₃). Próbki inkubowano w 67°C przez 2 godziny i worteksowano co 15 minut, a następnie wirowano próbki w celu usunięcia kulek agarozowych Protein A/G PLUS-Agarose. Supernatant przenoszono do nowych próbek i inkubowano w 67°C przez całą noc. Po inkubacji próbki wirowano przy 10 000 rpm przez 3 minuty w celu pozbycia się pozostałych kulek agarozowych Protein A/G PLUS-Agarose beads. Z uzyskanego supernatantu izolowano DNA. Do uzyskanego supernatantu dodawano równą objętość mieszaniny fenol: chloroform: alkohol izoamylowy (25:24:1), mieszano delikatnie na rotorze przez 5 minut, a następnie wirowano przez 10 minut przy 10 000 rpm w temperaturze pokojowej. Supernatant przenoszono do nowych próbek i powtarzano wcześniej wykonany krok. Do uzyskanego supernatantu dodawano równą objętość mieszaniny chloroform: alkohol izoamylowy (24:1), mieszano delikatnie na rotorze przez 2 minuty, a następnie wirowano 1 minutę przy 10 000 rpm. Supernatant przenoszono do nowej próbki, dodawano 2 objętości 100% etanolu, delikatnie mieszano i inkubowano w 20 °C przez całą noc. Po inkubacji próbki wirowano przy 14 000 rpm przez 20 minut. Wirowanie w tych warunkach powtarzano po usunięciu supernatantu i dodaniu 1 ml 95 % etanolu. Po wirowaniu usuwano supernatant, a uzyskany DNA suszono w temperaturze pokojowej, a następnie rozpuszczano w sterylnej wodzie. Preparat zawierający DNA przechowywano w temperaturze -20 °C.

6.14.1. Ilościowa analiza DNA otrzymanego po immunoprecypitacji chromatyny z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym

Real Time PCR pozwala na ilościową analizę DNA uzyskanego na drodze immunoprecypitacji chromatyny z zastosowaniem przeciwciał niespecyficznych (kontrola) oraz przeciwciał rozpoznających badane białko.

Reakcję przeprowadzono za pomocą termocyklera Mastercycler[®] ep realplex (Eppendorf), w próbkach zawierających 1 µl DNA oraz 9 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 6,5 µl wody, 0,25 µl startera F i 1 µl startera R (komplementarnych do regionów promotorowych badanych genów; **Tabela 6**) oraz 2 µl buforu reakcyjnego (5x HOT FIREPol[®] Eva Green[®] qPCR Mix Plus (ROX)). Kolejnymi etapami były: denaturacja wstępna w temperaturze 95°C przez 12 minut oraz 40 cykli obejmujących inkubację w temperaturze 95°C przez 15 sekund, 61 °C przez 20 sekund i 72 °C przez 20 sekund.

Tabela 6. Charakterystyka starterów stosowanych w analizie ilościowej DNA za pomocą Real Time PCR.

Gen	Sekwencja starterów	
<i>PTEN</i>	F	CGGGCGGTGATGTGGC
	R	GCCTCACAGCGGCTCAACTCT
<i>PHLPP1</i>	F	AGACGGGGCCAGCGATCCTGTGAA
	R	GTCGAGGATACCCAGAAGA
<i>PHLPP2</i>	F	ATGTGGTTTCATGTGTTTGTICTCA
	R	CATGGCTTTGTTTTAAAATGGAGTG

Uzyskane wartości c_t odpowiednio dla immunoprecypitatów chromatyny oraz prób wyjściowej chromatyny posłużyły do obliczenia tzw. procentu wyjściowej ilości chromatyny, który pozwala na ocenę różnicy w ilości fragmentów regionów promotorowych badanych

genów, które uzyskano w wyniku immunoprecypitacji w poszczególnych próbkach. Do obliczeń zastosowano wzór:

$$\% \text{ wyjściowej chromatyny} = 100 * 2^{\Delta ct [\text{znormalizowany ChiP}]}$$

$$\Delta ct [\text{znormalizowany ChiP}] = (c_t [\text{ChiP}] - c_t [\text{wyjściowej chromatyny}]) - \text{Log}_2 \text{ IDF}$$

Gdzie: **IDF** (ang. *Input Dilution Factor*) to współczynnik rozcieńczenia wyjściowej chromatyny, czyli stosunek frakcji chromatyny przeznaczonych do immunoprecypitacji względem frakcji pozostawionej wyjściowej chromatyny pomnożony przez jej rozcieńczenie przed rozpoczęciem reakcji Real Time PCR (141).

6.15. Analiza statystyczna

Wyniki badań opracowano w programie statystycznym GraphPad Prism 5. Analizę densytometryczną uzyskanych wyników przeprowadzono w programie Gel Pro 3.0 (Media Cybernetics). W przypadku danych klinicznych w celu porównania grup zastosowano test U Manna-Whitneya oraz Kruskala-Walisa. Korelacje pomiędzy ekspresjami określono za pomocą korelacji Spermmana.

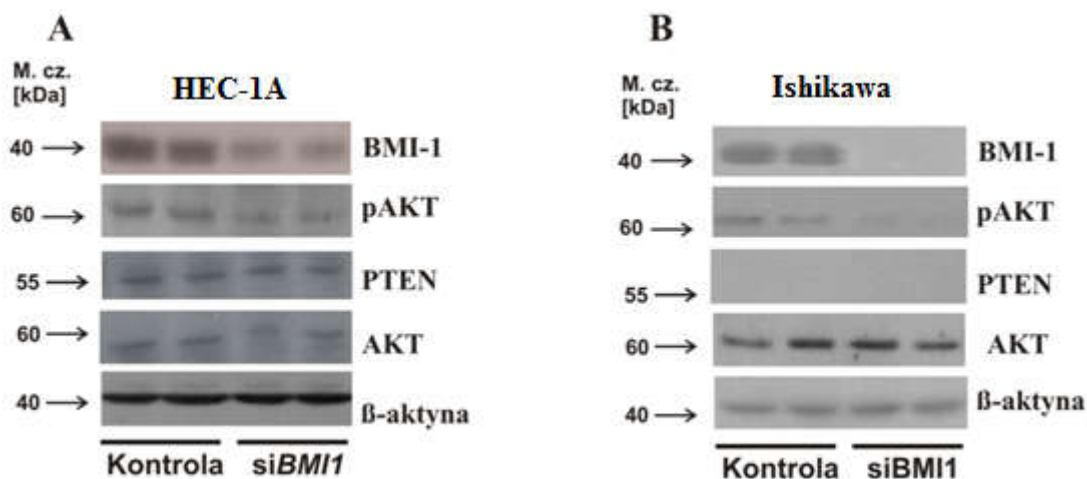
W celu porównania różnic między komórkami nietraktowanymi i traktowanymi użyto sparowanego testu T-Studenta. Jako wartość istotnie statystyczną przyjęto dla $p < 0,05$.

7. Wyniki

7.1. Wpływ wyciszenia ekspresji genu *BMII* w komórkach raka endometrium HEC-1A oraz Ishikawa na fosforylację kinazy AKT i ekspresję genów fosfataz zaangażowanych w jej regulację

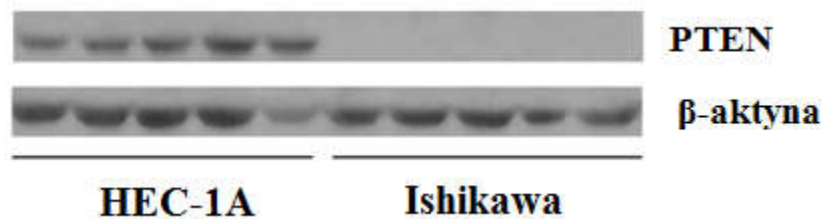
Zaburzenia szlaku PI3K/AKT są jedną z najlepiej poznanych nieprawidłowości w raku endometrium (162). Dane literaturowe sugerują związek pomiędzy BMI-1 a fosforylacją kinazy AKT w wielu typach nowotworów (280).

W związku z tym, oceniono wpływ BMI-1 na fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję fosfataz zaangażowanych w jej regulację w komórkach raka endometrium HEC-1A oraz Ishikawa. W tym celu ekspresję genu *BMII* w badanych liniach komórkowych zmniejszono metodą interferencji RNA. Wpływ interferencji *BMII* na fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję genów fosfataz działających bezpośrednio (*PHLPP1*, *PHLPP2*, *PP2A*) oraz pośrednio (*PTEN*) na aktywność AKT określono za pomocą metody Real Time PCR oraz Western Blotting. W przypadku obu linii komórkowych raka endometrium w wyniku interferencji *BMII* dochodzi do znacznego spadku ekspresji białka BMI-1 (**Ryc.7**). Obserwuje się również znaczny spadek poziomu fosforylacji kinazy AKT. W komórkach HEC-1A z wyciszoną ekspresją *BMII* nie obserwuje się zmian w ilości białka PTEN, natomiast w komórkach Ishikawa nie zaobserwowano w ogóle obecności tego białka.



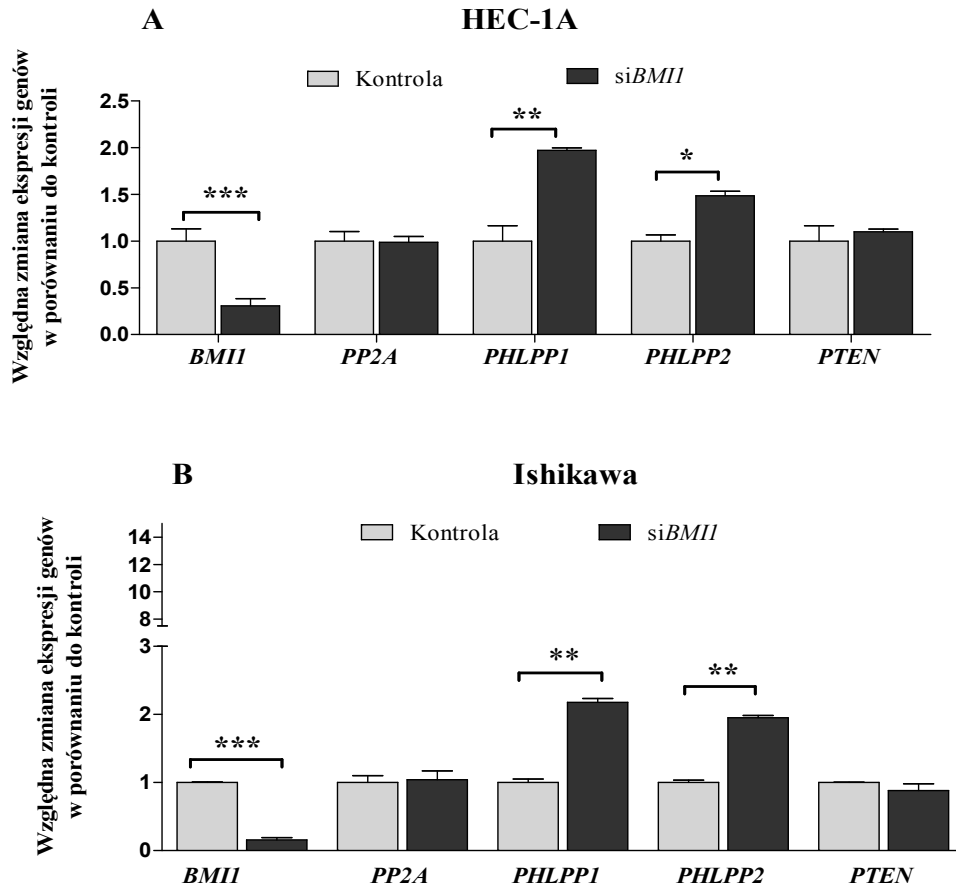
Rycina 7. Wyciszenie ekspresji *BMII* wpływa na fosforylację kinazy AKT. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji BMI-1, PTEN, AKT oraz fosforylowanej na Ser473 formy kinazy AKT w komórkach w linii HEC-1A (**A**) i Ishikawa (**B**) 48 godzin po traktowaniu 30 nM *siBMI-1* oraz siRNA nie wykazującym homologii do genów człowieka (kontrola). Na rysunku przedstawiono wyniki z dwóch powtórzeń.

Dane literaturowe wskazują, że w przypadku linii komórkowej Ishikawa nie obserwuje się ekspresji białka PTEN. Wan i wsp. (2007) (227) wykazali, że linia komórkowa Ishikawa posiada dwa warianty transkrypcyjne genu *PTEN*, których ekspresja w tej linii jest wysoka. Pierwszy wariant transkrypcyjny posiada delecję w obrębie kodonu 289, a drugi w obrębie kodonu 318-319, poprzez którą dochodzi do utworzenia kodonu STOP. W wyniku tej z mutacji powstaje transkrypt, lecz z tego transkryptu nie powstaje białko PTEN (227). Aby to potwierdzić, wykonano immunodetekcję białka PTEN jednocześnie w próbkach lizatów z komórek HEC-1A i Ishikawa. Wynik analizy przedstawia **Ryc. 8**.



Rycina 8. Wyniki analizy ekspresji białka PTEN w linii komórkowej HEC-1A i Ishikawa. Na rysunku przedstawiono wyniki z 5 powtórzeń.

W związku z tym, że po wyciszeniu ekspresji *BMII* dochodzi do obniżenia poziomu fosforylacji kinazy AKT, określono również wpływ wyciszenia *BMII* na ekspresję genów fosfataz zaangażowanych w regulację aktywności kinazy AKT (*PP2A*, *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2*) (**Ryc. 9**). W przypadku obu linii komórkowych, wyciszenie ekspresji *BMII* znacząco wpływa na obniżenie poziomu mRNA (**Ryc. 9 A, B**). W wyniku interferencji *BMII* obserwuje się wyraźny wzrost ekspresji fosfataz *PHLPP1* i *PHLPP2*. (**Ryc. 9 A, B**).



Rycina 9. Efekt wyciszenia ekspresji BMI-1 na ekspresję genów fosfataz zaangażowanych w regulację aktywności kinazy AKT. Względna ekspresja genów *PP2A*, *PHLPP1*, *PHLPP2*, *PTEN* w stosunku do kontroli 48 godzin po wyciszeniu ekspresji *BMI1* w komórkach linii HEC-1A (A) i Ishikawa (B); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

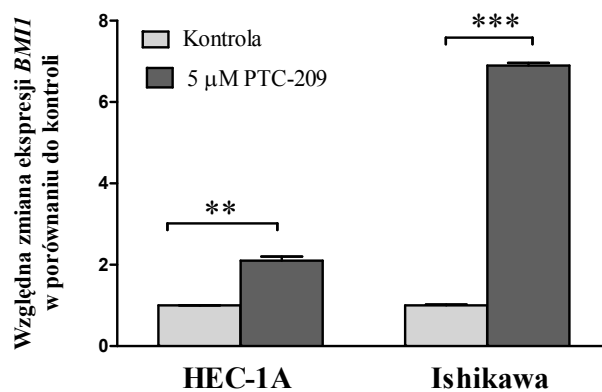
7.2. Wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 poprzez zastosowanie inhibitora PTC-209 na poziom fosforylacji kinazy AKT oraz ekspresję genów fosfataz w komórkach raka endometrium

PTC-209 to niskocząsteczkowy związek, będący jednym z inhibitorów ekspresji białka BMI-1. Wykazano, że w komórkach raka jelita grubego HCT116 i włókniakomięsaka HTC1080 związek ten obniża poziom transkryptyu genu *BMI1* poprzez przyłączenie się do sekwencji UTR mRNA (121). Jednak, w komórkach szpiczaka mnogiego oraz komórkach raka dróg żółciowych, PTC-209 hamuje ekspresję BMI-1 na poziomie białka, nie wpływając na poziom transkryptyu (236). Dane literaturowe wskazują, że inhibitor PTC-209 może mieć

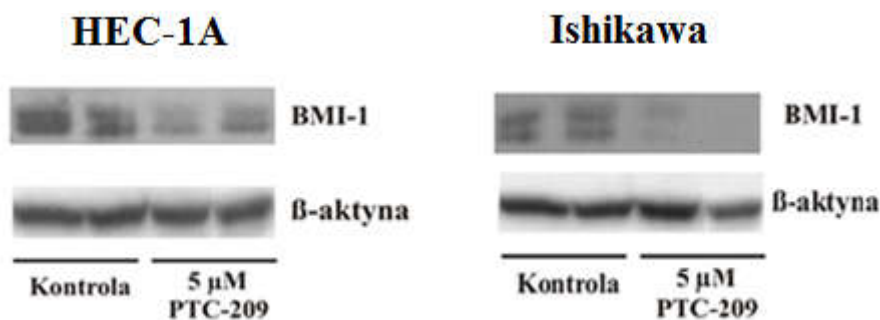
potencjalne zastosowanie w terapii nowotworów (208). W związku z potencjałem terapeutycznym PTC-209 i faktem, że nie stosowano tego związku w komórkach raka endometrium, w pracy doktorskiej określono wpływ PTC-209 na zahamowanie ekspresji BMI-1 i fosforylację AKT w komórkach linii HEC-1A i Ishikawa.

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie PTC-209 istotnie wpływa na wzrost ekspresji BMI-1 na poziomie mRNA (**Ryc. 10A**) oraz spadek na poziomie białka (**Ryc. 10B**). Wyniki te mogą świadczyć o tym, że PTC-209 w komórkach raka endometrium może wpływać na zahamowanie translacji białka BMI-1. Wzrost ekspresji na poziomie mRNA przy wyraźnym spadku ilości białka może wskazywać na efektu kompensacji. W komórkach raka endometrium istnieje mechanizm regulujący ekspresję *BMI1* zależny od poziomu białka BMI-1.

A

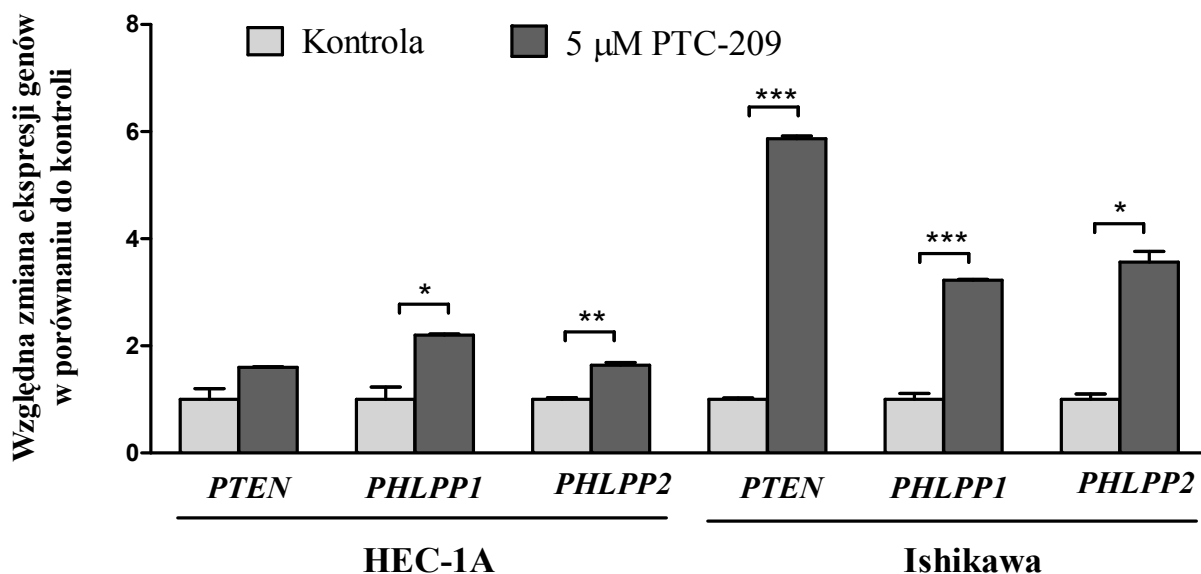


B



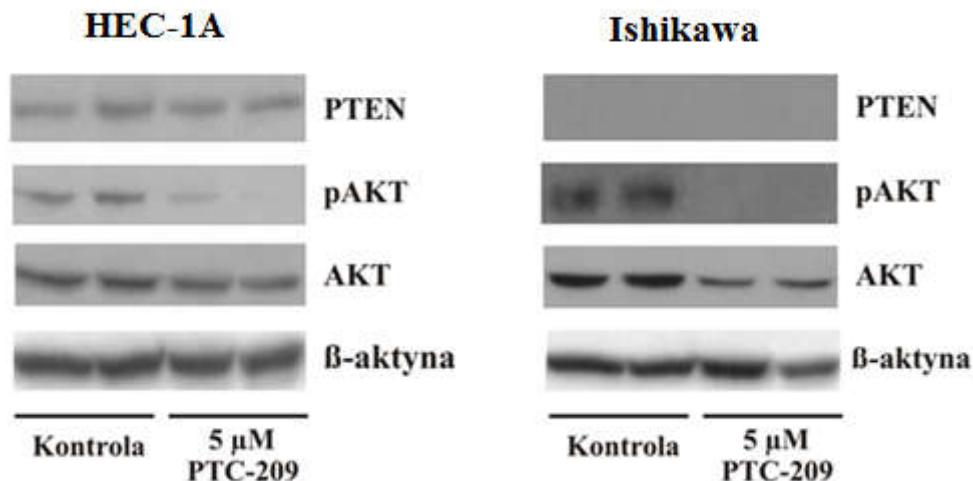
Rycina 10. Zastosowanie PTC-209 wpływa na wzrost poziomu mRNA oraz spadek poziomu białka BMI-1. Względna ekspresja genu *BMI1* na poziomie mRNA(A) oraz białka (B) w stosunku do kontroli 48 godzin po zastosowaniu PTC-209 w komórkach linii HEC-1A i Ishikawa; **p<0,01, *p<0,001.**

Następnie określono wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 przez PTC-209 na ekspresję genów fosfataz *PTEN*, *PHLPP1* oraz *PHLPP2*. Stwierdzono, że w obu typach komórek, PTC-209 powoduje istotny wzrost ekspresji dwóch fosfataz tj. *PHLPP1* i *PHLPP2* (Ryc. 11). W przypadku linii komórkowej Ishikawa obserwuje się również wzrost ekspresji mRNA *PTEN* po zastosowaniu PTC-209 (Ryc. 11).



Rycina 11. Zahamowanie ekspresji BMI-1 przez inhibitor PTC-209 wpływa na ekspresję genów fosfataz zaangażowanych w regulację aktywności kinazy AKT. Względna ekspresja genów *PHLPP1*, *PHLPP2*, *PTEN* w stosunku do kontroli 48 godzin po zastosowaniu PTC-209 w komórkach linii HEC-1A i Ishikawa; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

Zastosowanie PTC-209 w obu liniach komórkowych znacząco zmniejsza fosforylację kinazy AKT (Ryc. 12). W linii komórkowej Ishikawa po zastosowaniu PTC-209 obserwuje się również spadek ekspresji AKT (Ryc. 12).

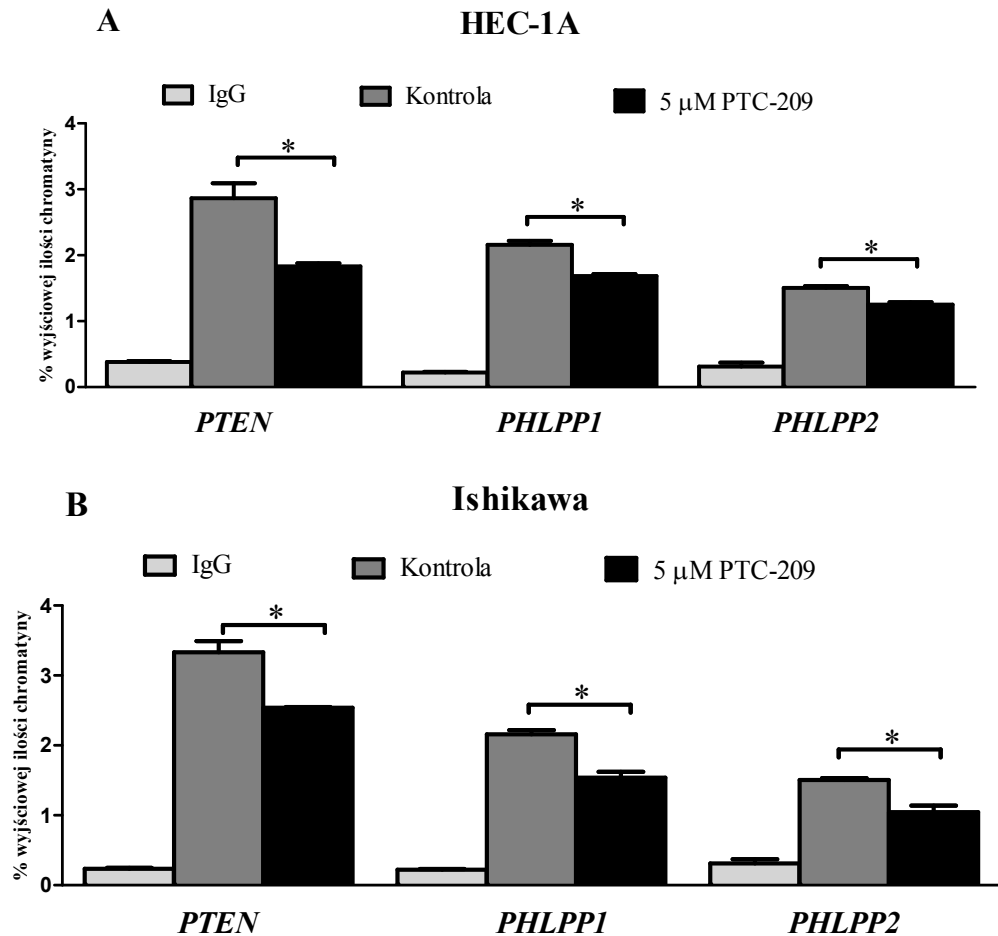


Rysunek 12. Zahamowanie ekspresji BMI-1 przez inhibitor PTC-209 wpływa na fosforylację kinazy AKT. Reprezentatywne wyniki analizy immunodetekcji BMI-1, PTEN, AKT oraz fosforylowanej na Ser473 formy kinazy AKT w komórkach HEC-1A i Ishikawa 72 godziny po traktowaniu komórek PTC-209.

7.3. Określenie lokalizacji białka BMI-1 w regionach promotorowych genów *PHLPP1*, *PHLPP2*, *PTEN* w komórkach raka endometrium

W związku z tym, że BMI-1 wpływa na zwiększoną ekspresję fosfataz *PHLPP1* i *PHLPP2*, przez co może przyczynić się do spadku fosforylacji AKT, określono czy BMI-1 lokalizuje się w miejscach promotorowych tych fosfataz. W tym celu zastosowano metodę immunoprecypitacji chromatyny, której opis znajduje się w Rozdziale 6.14. Otrzymane w wyniku immunoprecypitacji DNA poddano analizie ilościowej przy pomocy Real Time PCR. Zastosowane startery był komplementarne do regionów promotorowych badanych genów.

Wyniki analizy wykazały, że BMI-1 najprawdopodobniej może przyłączać się do regionów promotorowych genów *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* w obu liniach komórkowych, przez co może bezpośrednio regulować ich ekspresję.

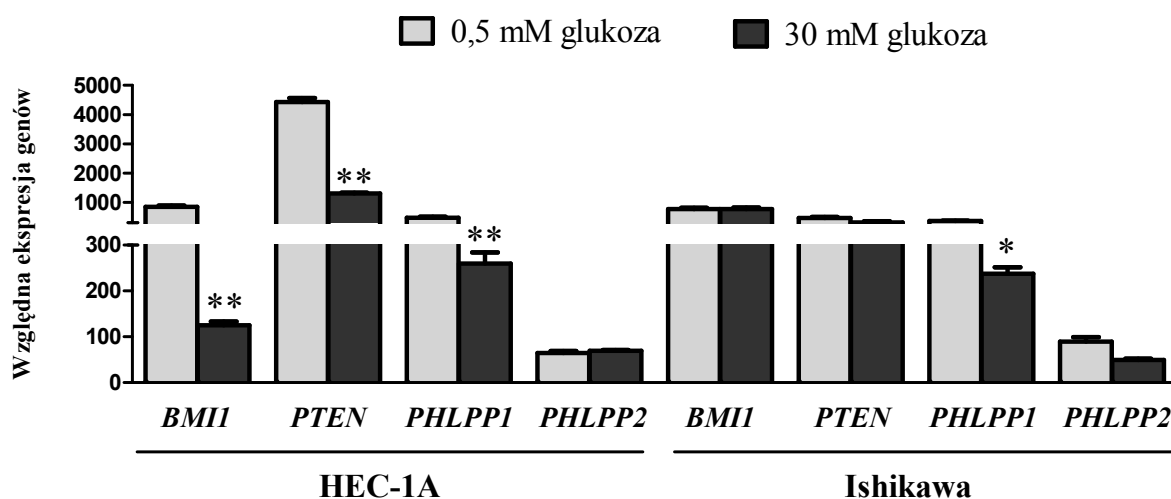


Rycina 13. BMI-1 przyłącza się do regionów promotorowych *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* w obu badanych liniach komórkowych. Po zastosowaniu PTC-209 dochodzi do zmniejszenia przyłączania się BMI-1 do miejsc promotorowych badanych genów. Kontrolę negatywną stanowiły próbki uzyskane w wyniku immunoprecypitacji chromatyny z wykorzystaniem przeciwciał klasy IgG; * $p < 0,05$.

7.4. Wpływ stężenia glukozy na zależną od BMI-1 fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję genów fosfatyz w komórkach raka endometrium

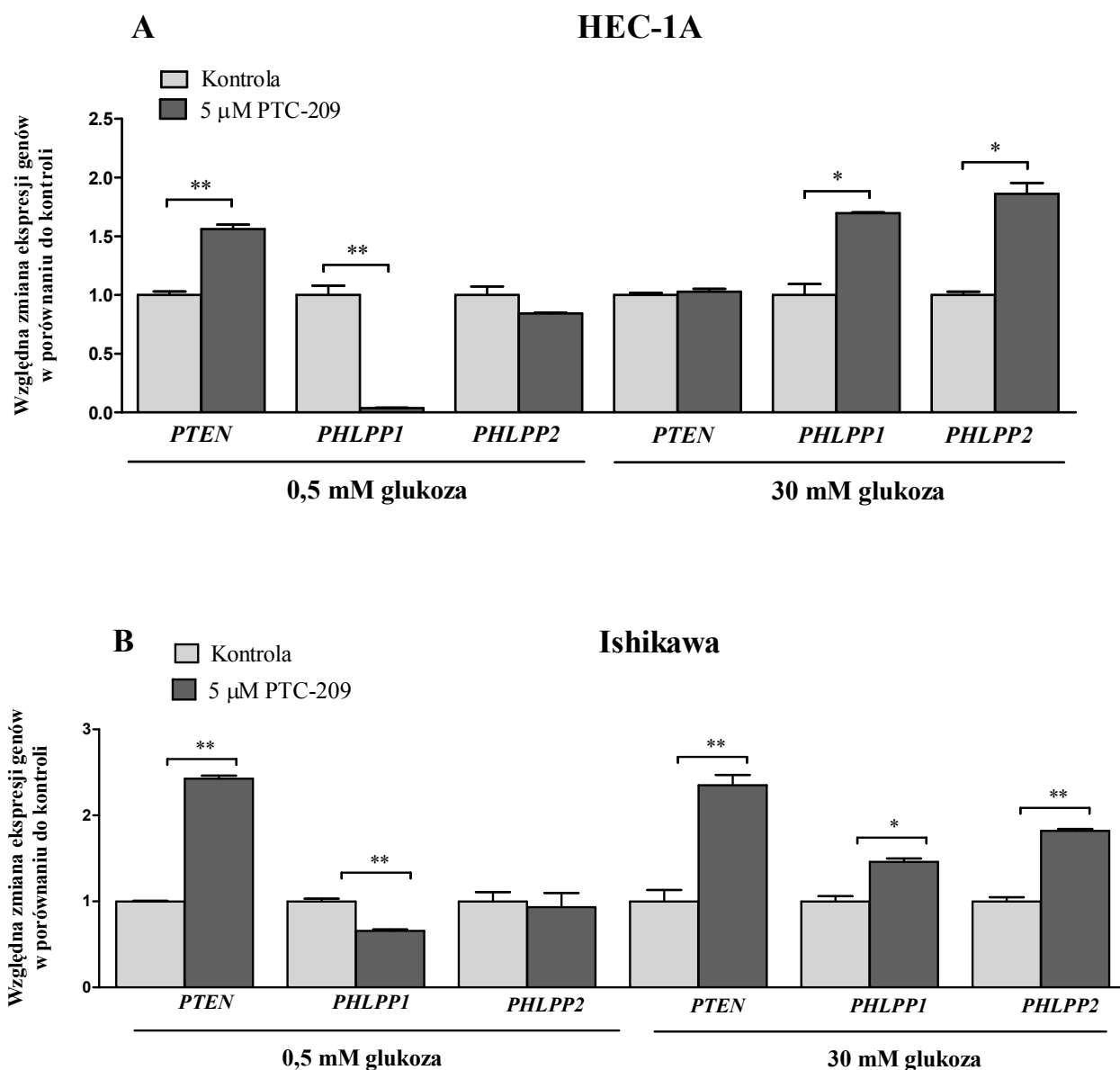
Dane literaturowe wskazują, że hiperglikemia ma znaczący wpływ na wzrost agresywności nowotworów wątroby, trzustki, piersi czy endometrium (189). Sugeruje się, że może mieć to związek ze szlakiem kinazy AKT (153). W związku z tym, określono wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 na aktywność kinazy AKT oraz ekspresję *PTEN*, *PHLPP1* oraz *PHLPP2* w warunkach hipo- (0,5 mM glukoza) i hiperglikemii (30 mM glukoza) w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa.

W pierwszym etapie oceniono ekspresję genów *BMI1*, *PTEN*, *PHLPP1* oraz *PHLPP2* w badanych liniach komórkowych w warunkach hipo- i hiperglikemii na poziomie mRNA. Wykazano, że ekspresja *BMI1*, *PTEN*, *PHLPP1* w komórkach HEC-1A jest znacznie wyższa w warunkach hipo- niż hiperglikemii (**Ryc. 14**). W komórkach Ishikawa jedynie ekspresja *PHLPP1* była wyższa w warunkach hipo- niż hiperglikemii (**Ryc. 14**).



Rycina14. Wpływ warunków hipo- (0,5 mM glukoza) i hiperglikemii (30 mM glukoza) na ekspresję *BMI1* genów fosfataz regulujących fosforylację kinazy AKT. Względna ekspresja genów *BMI1*, *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* w komórkach HEC-1A (A) oraz Ishikawa (B) hodowanych w warunkach hipo- i hiperglikemii; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

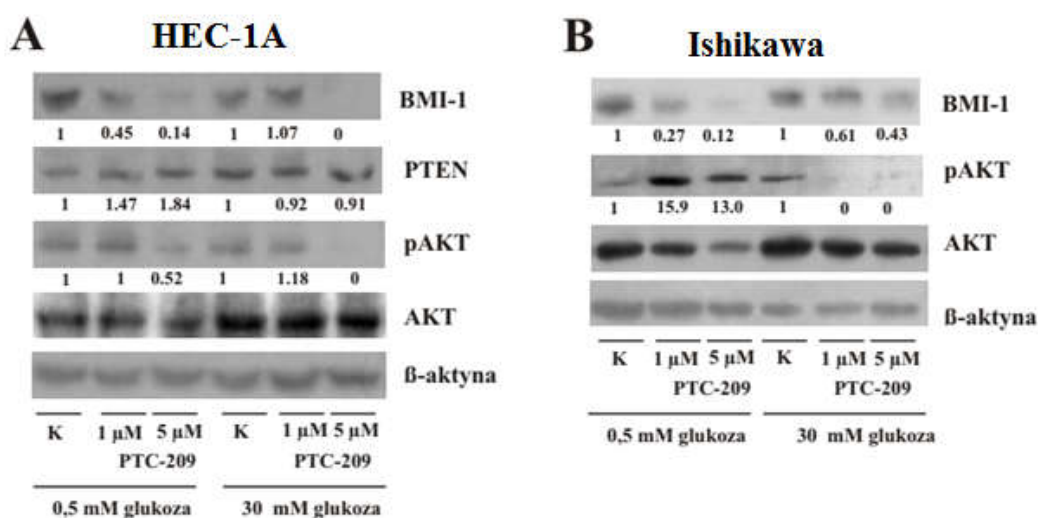
Następnie określono wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 przez inhibitor PTC-209 na ekspresję *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* w warunkach hipo- i hiperglikemii. Po zastosowaniu inhibitora PTC-209 zaobserwowano spadek ekspresji *PHLPP1* oraz wzrost ekspresji *PTEN* w warunkach hipoglikemii w linii HEC-1A (**Ryc. 16A**). W warunkach hiperglikemii w HEC-1A po zahamowaniu ekspresji BMI-1 dochodzi do wzrostu ekspresji *PHLPP1* oraz *PHLPP2* (**Ryc. 16A**). W przypadku linii Ishikawa, zahamowanie ekspresji BMI-1 wpływa na wzrost ekspresji *PTEN* oraz spadek ekspresji *PHLPP1* w warunkach hipoglikemii (**Ryc. 16B**). W warunkach hiperglikemii obserwuje się wzrost ekspresji *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* po zastosowaniu PTC-209 w linii Ishikawa (**Ryc. 16B**).



Rycina 16. Efekt zahamowania ekspresji BMI-1 przez inhibitor PTC-209, na ekspresję fosfataz zaangażowanych w regulację aktywności kinazy AKT w warunkach hipoglikemii i hiperglikemii. Względna ekspresja genów *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem BMI-1 w linii HEC-1A (A) oraz Ishikawa (B) w warunkach hipoglikemii (0,5 mM glukoza) i hiperglikemii (30 mM glukoza); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

PTC-209 efektywnie hamuje ekspresję BMI1 w warunkach hipo- i hiperglikemii w obu typach komórek. W linii HEC-1A w warunkach hipoglikemii po zastosowaniu PTC-209 obserwuje się wzrost ekspresji PTEN oraz spadek poziomu fosforylacji kinazy AKT zarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii. (Ryc. 17A).

Po zastosowaniu PTC-209 w linii Ishikawa obserwuje się wyraźny wzrost poziomu fosforylowanej kinazy AKT przy jednoczesnym spadku jej ogólnej ekspresji. Spadek poziomu fosforylacji AKT po zastosowaniu PTC-209 był obserwowany także w warunkach hiperglikemii (Ryc. 17B).

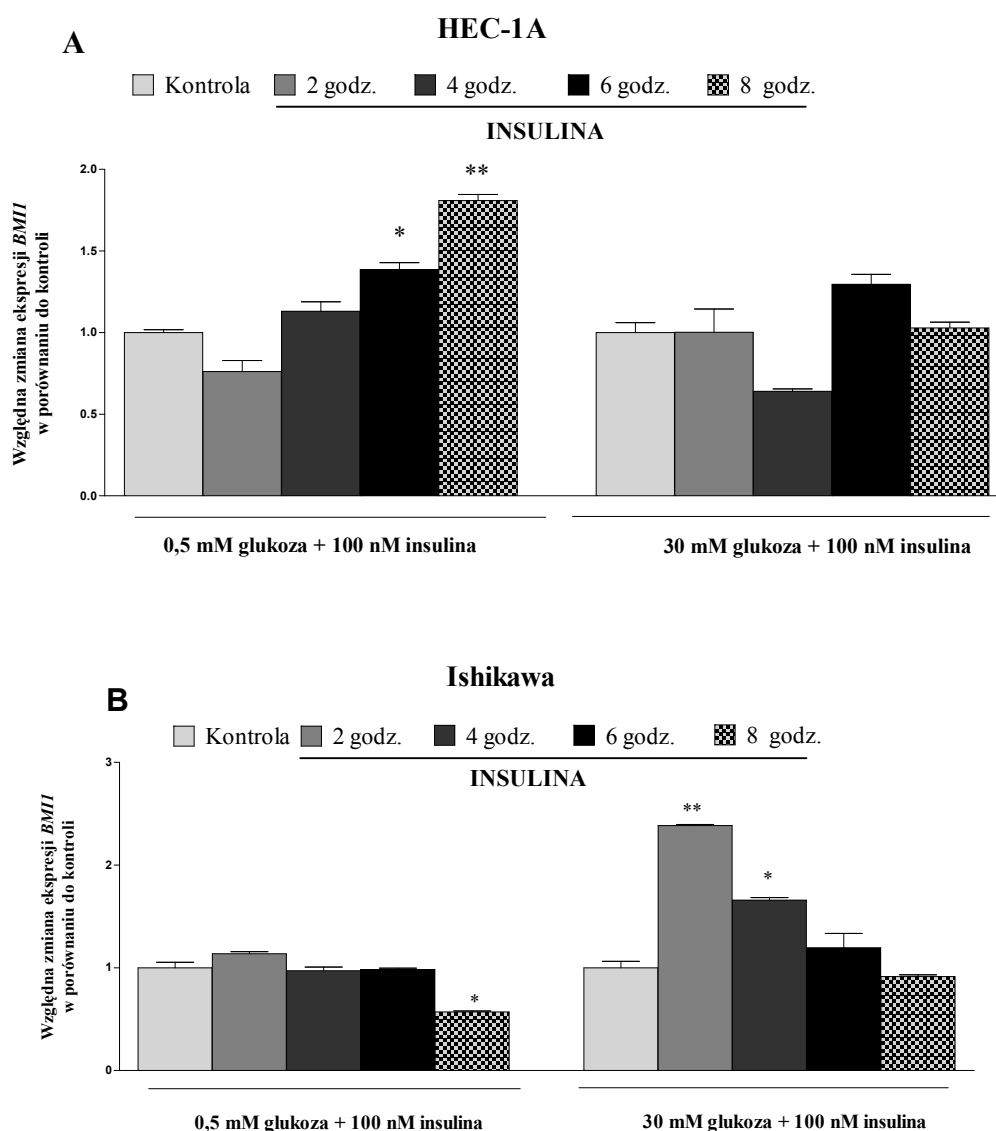


Rysunek 17A. Efekt zahamowania ekspresji BMI-1 przez PTC-209, na fosforylację kinazy AKT oraz ekspresję AKT oraz PTEN w warunkach hipo- i hiperglikemii. A,B: Reprezentatywne wyniki analizy Western blotting przedstawiają ekspresję BMI-1, PTEN, AKT oraz fosforylowaną na na Ser473 kinazę AKT w linii HEC-1A (A) i Ishikawa (B) 48 godziny po traktowaniu komórek inhibitorem BMI-1 w warunkach hipo- i hiperglikemii. Liczby pod wynikami immuodetekcji to wartości zintegrowanej gęstości optycznej znormalizowane względem β-aktyny.

7.5. Wpływ stymulacji insuliną na ekspresję BMI-1 w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa w warunkach hipo- i hiperglikemii

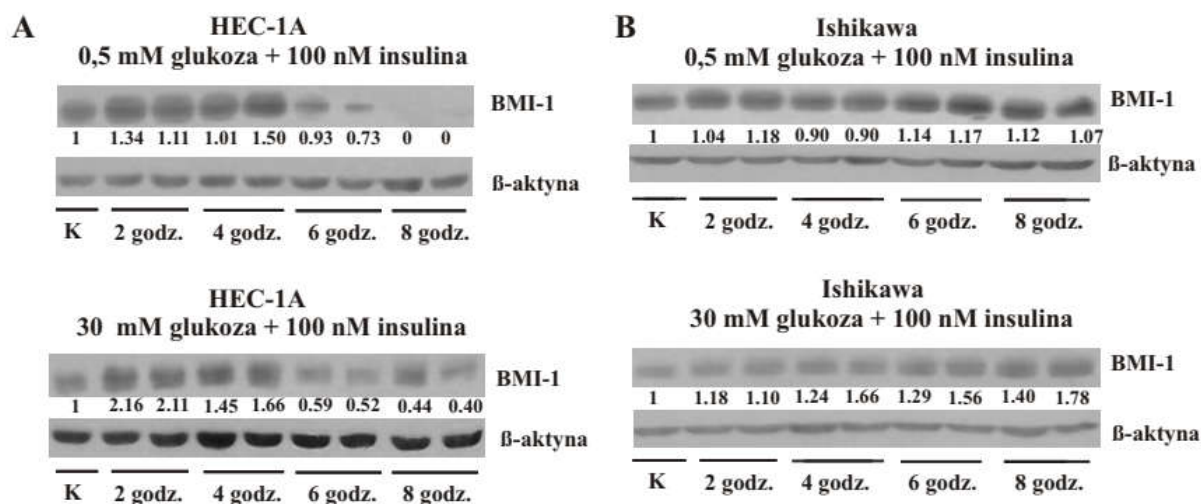
Ekspresję BMI-1 badano również w komórkach hodowanych w warunkach hipo- i hiperglikemii oraz stymulacji insuliną. W tym celu komórki raka endometrium wysiewano,

a następnie hodowano przez 24 godziny w medium bez surowicy w warunkach hipo- (0,5 mM glukoza) lub hiperglikemii (30 mM glukoza). Następnego dnia komórki stymulowano 100 nM insuliną, po czym komórki zbierano po 2, 4, 6 i 8 godzinach od momentu dodania insuliny. W przypadku komórek linii HEC-1A zaobserwowano wyraźny wzrost ekspresji *BMII* po 6 i 8 godzinach stymulacji insuliną w warunkach hipoglikemii (**Ryc. 18A**). W przypadku linii Ishikawa zaobserwowano spadek ekspresji *BMII* po 8 godzinach stymulacji insuliną w warunkach hipoglikemii oraz wzrost ekspresji *BMII* w 2 i 4 godzinie stymulacji insuliną (**Ryc. 18B**).



Rycina 18. Wpływ hipo- i hiperglikemii oraz hiperinsulinemii na ekspresję *BMII*. Względna ekspresja *BMII* w porównaniu do kontroli w warunkach hipo- i hiperglikemii oraz po 2, 4, 6, 8 godzinach stymulacji insuliną w linii HEC-1A (**A**) oraz Ishikawa (**B**); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

Analiza ekspresji białka BMI-1 metodą Western Blotting wykazała, że w komórkach HEC-1A hodowanych zarówno w warunkach hipo-, jak i hiperglikemii po stymulacji insuliną obserwuje się początkowo wzrost, a po czterech godzinach spadek ekspresji BMI-1 (Ryc. 19A). W linii komórkowej Ishikawa w jedynie w warunkach hiperglikemii obserwuje się nieznaczny wzrost ekspresji BMI-1 po stymulacji insuliną utrzymujący się do 8 godzin (Ryc. 19B).



Rycina 19. Wpływ hipo-lub hiperglikemii oraz hiperinsulinemii na ekspresję BMI-1.

Wyniki immunodetekcji białka BMI-1 w komórkach HEC-1A (A) oraz Ishikawa (B) hodowanych w warunkach hipo- i hiperglikemii po 2, 4, 6 i 8 godzinach stymulacji insuliną; **K**- kontrola, komórki nie stymulowane. Liczby pod wynikami immunodetekcji to wartości zintegrowanej gęstości optycznej znormalizowane względem β -aktyny.

7.6. Wpływ stymulacji insuliną na zależną od BMI-1 regulację ekspresji genów fosfatyz oraz fosforylację kinazy AKT w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa

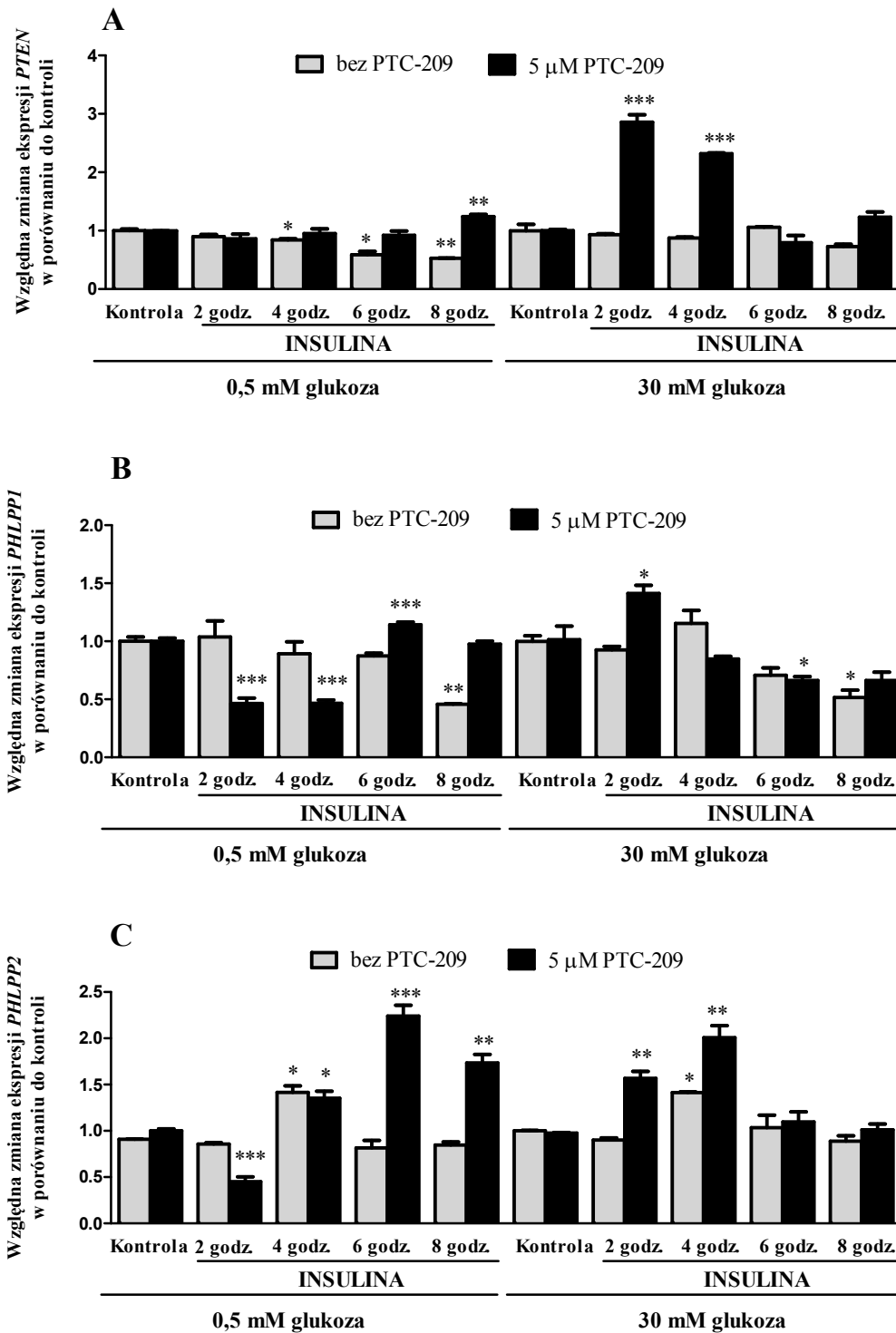
W związku z tym, że działanie BMI-1 może mieć związek z insulino opornością oceniono wpływ stymulacji insuliną na zależną od BMI-1 regulację ekspresji genów fosfatyz *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* oraz ekspresję białka PTEN i poziom fosforylacji kinazy AKT na Ser473 w komórkach HEC-1A i Ishikawa.

W tym celu badane komórki hodowano w warunkach hipo- lub hiperglikemii, a następnie inkubowano 24 godziny w medium bez surowicy, bez lub z inhibitorem PTC-209. Po 24 godzinach komórki stymulowano insuliną (100 nM) przez 2, 4, 6, 8 godzin.

W warunkach hipoglikemii w komórkach HEC-1A po stymulacji insuliną dochodzi do spadku ekspresji *PTEN*. Efekt odwrotny w tych warunkach obserwuje się po zastosowaniu inhibitora PTC-209. W warunkach hiperglikemii i stymulacji insuliną wzrost ekspresji *PTEN* obserwuje się jedynie po zastosowaniu inhibitora PTC-209 (**Ryc. 20A**).

W przypadku *PHLPP1*, w warunkach hipoglikemii i stymulacji insuliną spadek jej ekspresji następuje znacznie szybciej po zastosowaniu inhibitora PTC-209, a w warunkach hiperglikemii jest znacznie większy po zastosowaniu inhibitora PTC-209 (**Ryc. 20B**).

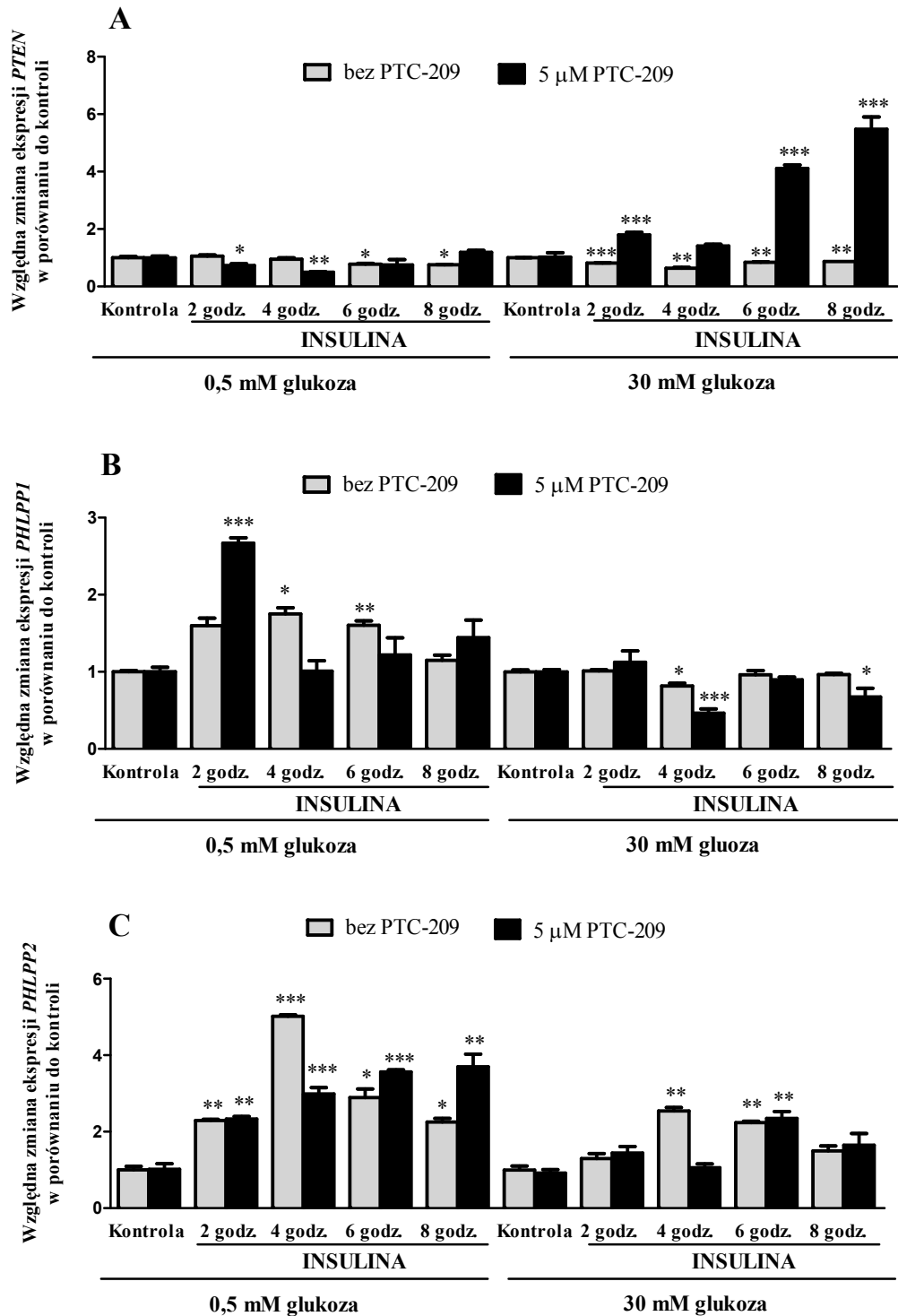
Wzrost ekspresji *PHLPP2* w warunkach hipoglikemii i stymulacji insuliną utrzymuje się znacznie dłużej po zastosowaniu inhibitora PTC-209, a w warunkach hiperglikemii wzrost ten następuje szybciej po zastosowaniu inhibitora PTC-209 (**Ryc. 20C**).



Rycina 20. Wpływ insuliny i PTC-209 na ekspresję genów *PTEN*, *PHLPP1* i *PHLPP2* w komórkach HEC-1A. Względna ekspresja genów *PTEN* (A), *PHLPP1* (B), *PHLPP2* (C) w komórkach nietraktowanych PTC-209 (bez PTC-209) lub traktowanych 5 μMPTC-209 i hodowanych w warunkach hipo- lub hiperglikemii oraz stymulowanych insuliną (przez 2,4, 6, i 8 godzin); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń. Kontrolę stanowiły komórki nie stymulowane insuliną.

W komórkach Ishikawa zarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii stymulacja insuliną prowadzi do spadku ekspresji mRNA *PTEN*. Z tym, że w warunkach hipoglikemii spadek następuje znacznie szybciej po zastosowaniu inhibitora PTC-209, a w warunkach hiperglikemii po zastosowaniu PTC-209 obserwuje się wyraźny wzrost ekspresji *PTEN* (**Ryc. 21A**).

W przypadku *PHLPP1* w warunkach hipoglikemii i stymulacji insuliną wzrost następuje szybciej po zastosowaniu PTC-209, a w hiperglikemii większy spadek obserwuje się po zastosowaniu PTC-209 (**Ryc. 21B**). Wzrost ekspresji *PHLPP2* w warunkach hipoglikemii i stymulacji insuliną utrzymuje się dłużej po zastosowaniu PTC-209, a w przypadku hiperglikemii wzrost ten utrzymuje się krócej po zastosowaniu PTC-209 (**Ryc. 21C**).



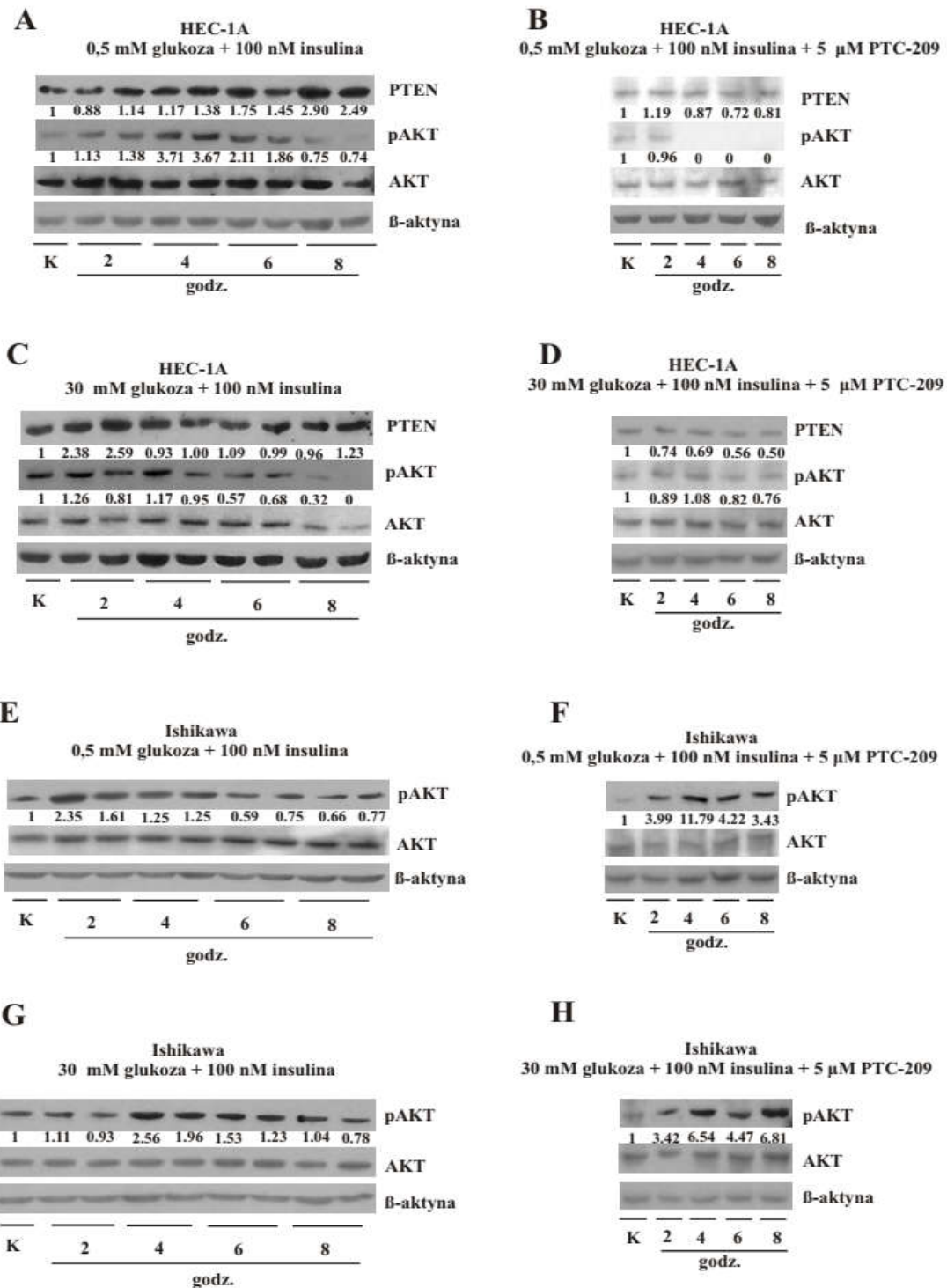
Rycina 21. Wpływ insuliny i PTC-209 na ekspresję genów *PTEN*, *PHLPP1* i *PHLPP2* w komórkach Ishikawa. Względna ekspresja genów *PTEN* (A), *PHLPP1* (B), *PHLPP2* (C) w komórkach nietraktowanych PTC-209 (bez PTC-209) lub traktowanych 5 μM PTC-209 i hodowanych w warunkach hipo- lub hiperglikemii oraz stymulowanych insuliną (przez 2,4, 6, i 8 godzin) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń. Kontrolę stanowiły komórki nie stymulowane insuliną.

Następnie oceniono wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 na ekspresję białka PTEN i poziom fosforylacji kinazy AKT. Reprezentatywne wyniki immunodetekcji przedstawia **Ryc. 22**, natomiast na **Ryc. 23** zamieszczono wyniki analizy densytometrycznej ekspresji PTEN oraz poziomu fosforylacji kinazy AKT.

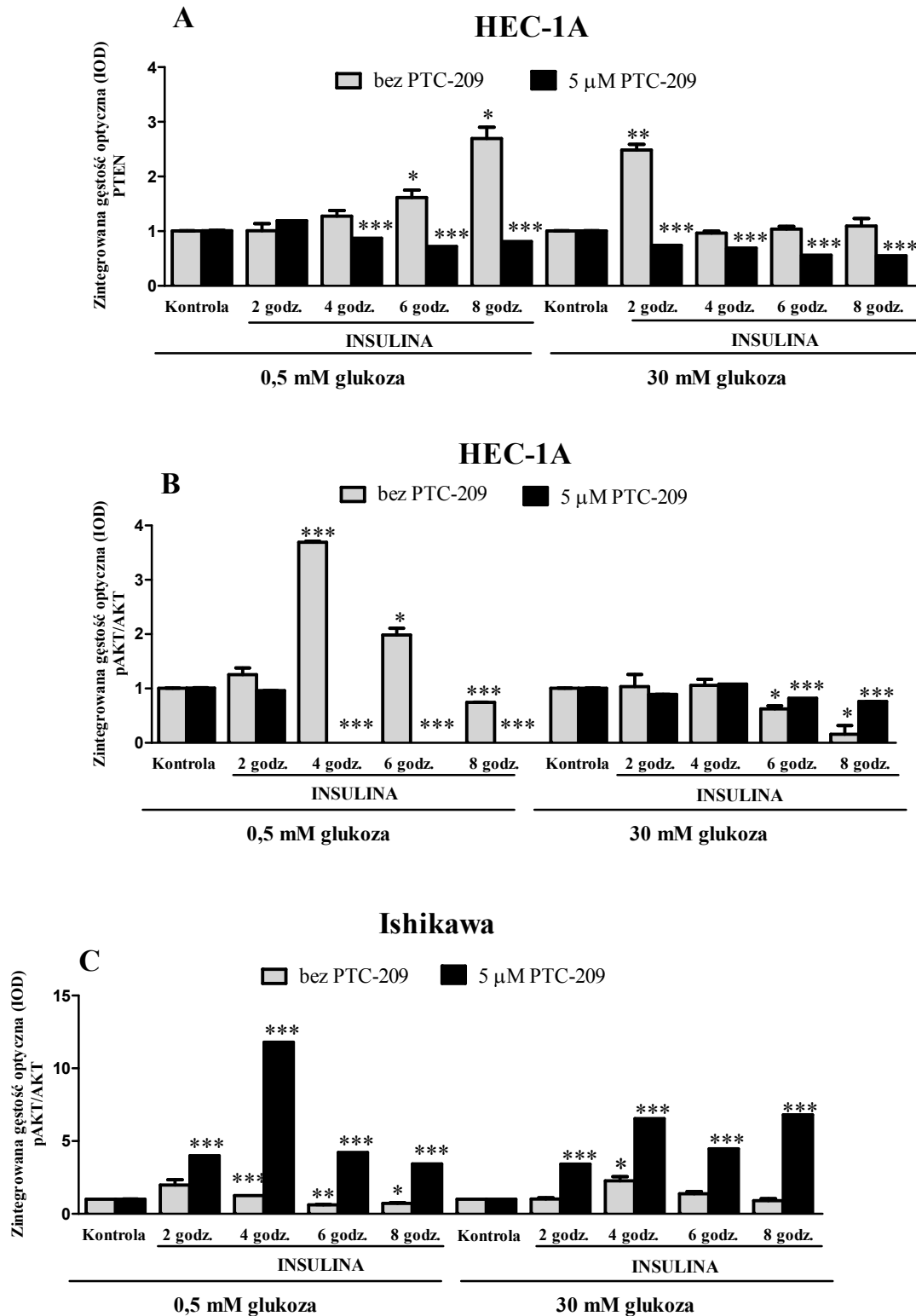
W warunkach hipoglikemii i stymulacji insuliną dochodzi do wyraźnego wzrostu ekspresji PTEN w komórkach HEC-1A (**Ryc. 22A**), natomiast w komórkach ze zmniejszoną ekspresją BMI-1 w wyniku zastosowania PTC-209, nie obserwuje się takiego wzrostu (**Ryc. 22B**). W warunkach hipoglikemii w linii HEC-1A w pierwszych sześciu godzinach następuje wzrost, a później spadek poziomu fosforylacji kinazy AKT (**Ryc. 22A**). Po zastosowaniu inhibitora PTC-209 w tych warunkach już po czterech godzinach stymulacji insuliną dochodzi do drastycznego spadku poziomu fosforylacji AKT (**Ryc. 22B**).

W warunkach hiperglikemii stymulacja insuliną prowadzi do wzrostu ekspresji PTEN tylko w pierwszych dwóch godzinach. Podczas przedłużonej stymulacji insuliną, następuje spadek ekspresji PTEN i ekspresja tautrzymuje się na poziomie podobnym jak w komórkach kontrolnych (**Ryc. 22C**). W warunkach hiperglikemii obserwuje się spadek poziomu fosforylacji AKT zarówno bez, jak i po zastosowaniu inhibitora PTC-209 w linii HEC-1A (**Ryc. 22D**). Wyniki te mogą sugerować, że zahamowanie ekspresji BMI-1 w linii komórkowej HEC-1A może wpływać na wrażliwość tych komórek na działanie insuliny zarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii.

Stymulacja insuliną komórek Ishikawazarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii powoduje wzrost, a następnie spadek poziomu fosforylacji kinazy AKT (**Ryc. 22E, G**). Z tym, że wzrost w warunkach hipoglikemii obserwowany jest już po dwóch godzinach, a w warunkach hiperglikemii po 4. Zastosowanie PTC-209 powoduje, że wzrost poziomu fosforylacji podczas stymulacji insuliną utrzymuje się przez cały czas zarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii (**Ryc. 22F, H**). Wyniki te mogą sugerować że zahamowanie ekspresji BMI-1 wpływa na oporność komórek na działanie insuliny zarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii.



Rycina 22. Wpływ obniżonej ekspresji BMI-1 i stymulacji insuliną na ekspresję PTEN, AKT oraz poziom fosforylacji kinazy AKT w warunkach hipo- i hiperglikemii. Reprezentatywne wyniki ekspresji PTEN, AKT oraz fosforylacji kinazy AKT na Ser473 w warunkach hipo- i hiperglikemii oraz po 2, 4, 6, 8 godzinach stymulacji insuliną w komórkach HEC-1A (A-D) oraz Ishikawa (E-H) nietraktowanych lub traktowanych 5 μM PTC-209; K- kontrola.



Rycina 23. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białka PTEN oraz fosforylacji AKT w warunkach hipo- i hiperglikemii i stymulacji insuliną oraz bez lub po zastosowaniu PTC-209. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

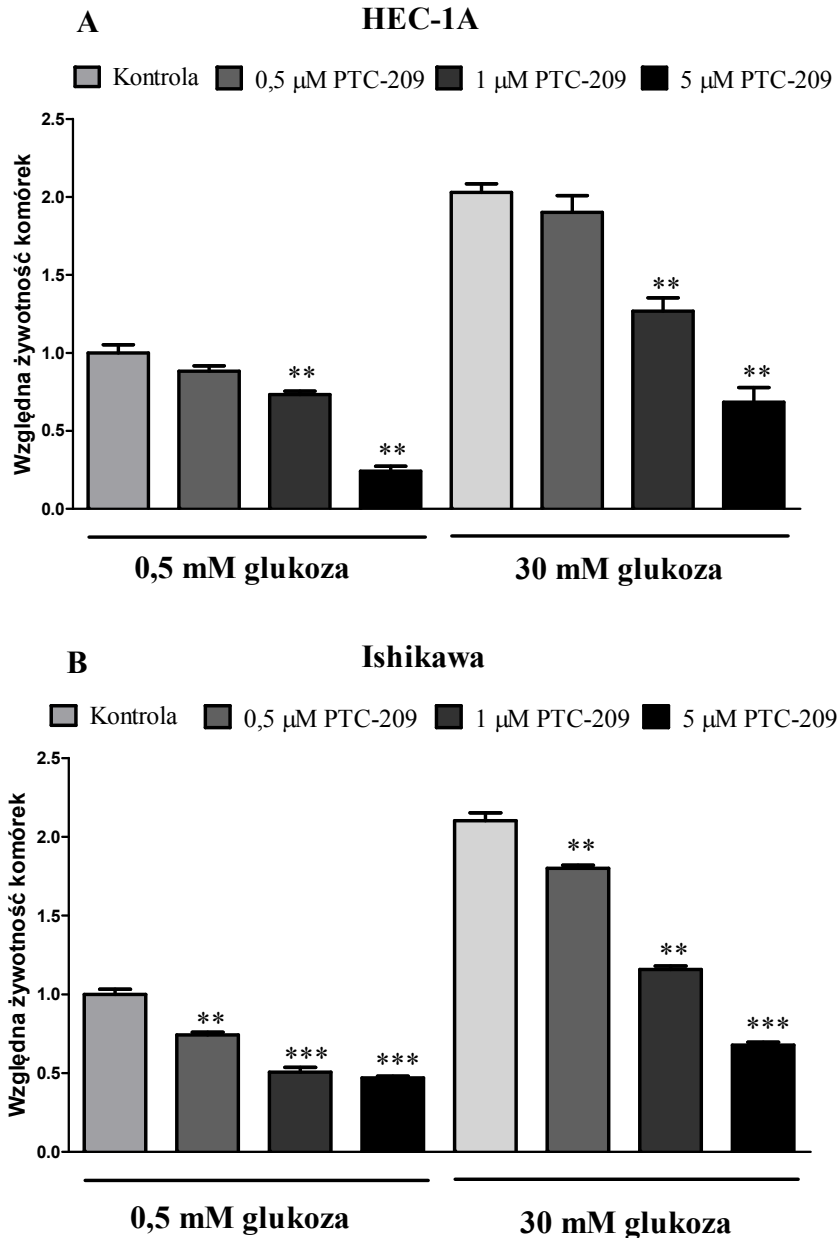
7.7. Wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 w warunkach hipo- i hiperglikemii na żywotność i proliferację komórek raka endometrium

Kreso i wsp. (2014) jako pierwsi scharakteryzowali PTC-209 jako inhibitor Bmi-1 w mysim modelu raka jelita grubego. Wykazali, że zastosowanie PTC-209 znacznie obniżało wzrost guza nowotworowego u tych myszy, co było spowodowane hamowaniem mitozy komórek, a także ich zwiększoną apoptozą (121).

Dane literaturowe wykazują, że hiperglikemia może istotnie wpływać na powstawanie i progresję nowotworów. U pacjentów z cukrzycą lub hiperglikemią obserwuje się częściej rozwój nowotworów czy ich nawrót i przerzuty. Duan i wsp., zaobserwowali zwiększoną ekspresję BMI-1 i proliferację komórek raka trzustki pod wpływem wysokiego stężenia glukozy (55). W związku z tym określono wpływ zahamowania BMI-1 na żywotność i proliferację komórek raka endometrium HEC-1A oraz Ishikawa w warunkach hipo- i hiperglikemii.

Żywotność komórek po traktowaniu komórek linii HEC-1A oraz Ishikawa inhibitorem BMI-1 (0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M PTC-209) w warunkach hipo- (0,5 mM glukoza) i hiperglikemii (30 mM glukoza) oceniono metodą spektrofotometryczną z MTT (Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy). W celu porównania proliferacji w komórkach hodowanych w warunkach różnego stężenia glukozy, określono względną żywotność i proliferację komórek w odniesieniu do komórek kontrolnych (nie traktowanych PTC-209) i hodowanych w medium zawierającym 0,5 mM glukozę. Proliferację komórek badano po 48 godzinach od traktowania.

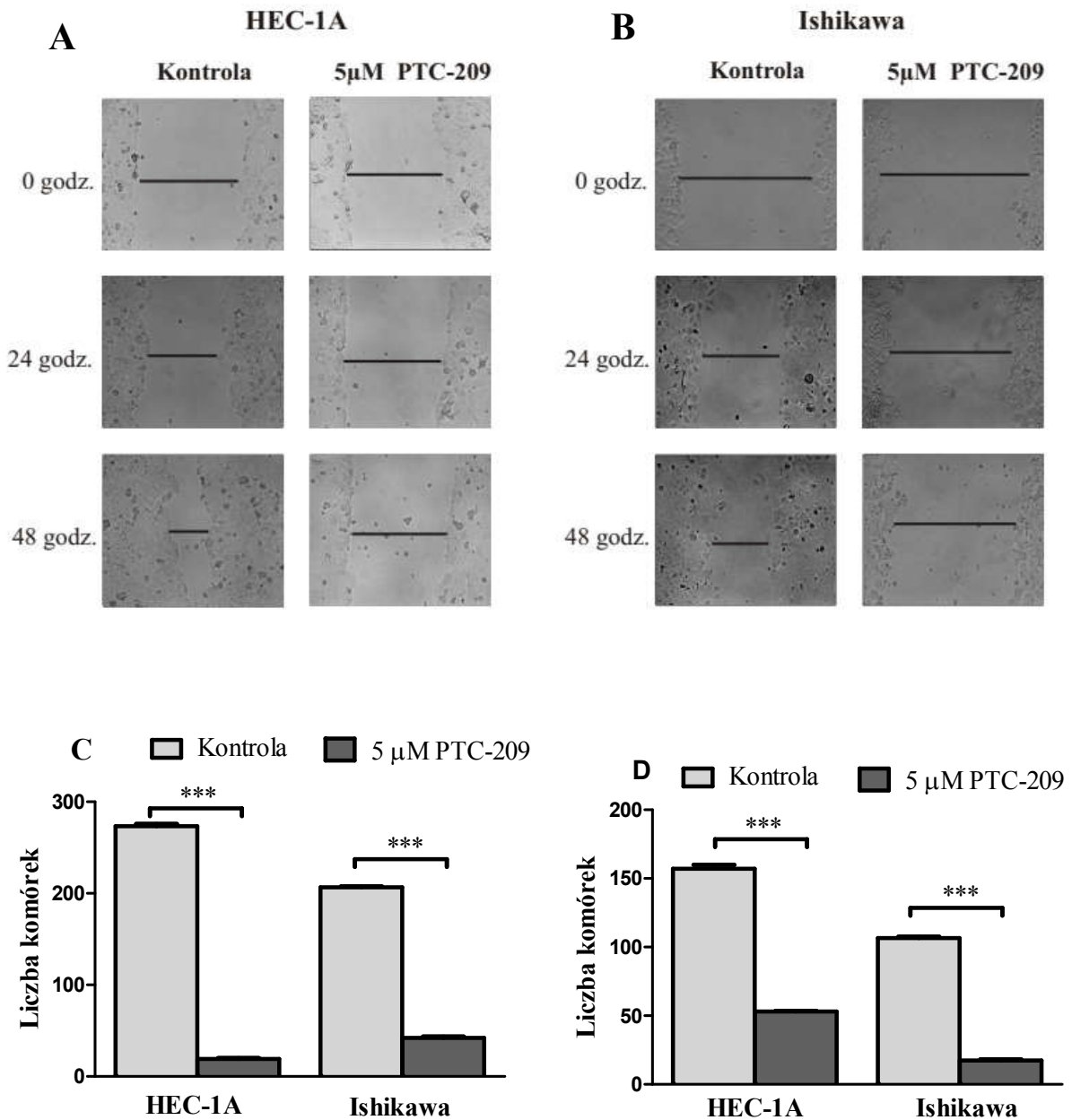
Żywotność komórek HEC-1A i Ishikawa po zahamowaniu ekspresji BMI-1 spada zarówno w warunkach hipo- jak i hiperglikemii (**Ryc. 24**). Żywotność komórek kontrolnych w warunkach hiperglikemii jest około dwukrotnie wyższa w porównaniu do komórek kontrolnych w warunkach hipoglikemii w obu liniach komórkowych. W przypadku linii HEC-1A żywotność po traktowaniu 5 μ M PTC-209 znacznie spada w warunkach hipoglikemii (spadek około 76 %) niż w warunkach hiperglikemii (spadek około 66 %) (**Ryc. 24A**). Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku linii komórkowej Ishikawa po traktowaniu 5 μ M PTC-209, gdzie proliferacja komórek w warunkach hipoglikemii spada o około 53 %, a w warunkach hiperglikemii o około 68 %. Wyniki badań sugerują, że BMI-1 istotnie wpływa na proliferację komórek raka endometrium (**Ryc. 24B**).



Rycina 24. Wyniki analizy wpływu PTC-209 na żywotność w warunkach hipoglikemii i hiperglikemii. Żywotność komórek w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem BMI-1 w warunkach hipoglikemii (0,5 mM glukoza) oraz hiperglikemii (30 mM glukoza) w linii HEC-1A (**A**) i Ishikawa (**B**). Jako punkt odniesienia przyjęto wartość dla komórek nietraktowanych PTC-209 i hodowanych w medium z 0,5 mM glukozą (wartość 1); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

7.8. Wpływ zahamowania ekspresji BMI-1 na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek raka endometrium oraz ekspresję genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne

BMI-1 odgrywa znaczącą rolę w migracji i inwazji komórek wielu typów nowotworów tj. rak piersi, jamz nosowo-gardowej, wątroby. W związku z tym oceniono wpływ zahamowania BMI-1 na migrację i inwazję komórek raka błony śluzowej trzonu macicy. Wpływ inhibitora białka BMI-1 na potencjał migracyjny i inwazyjny komórek określono przy użyciu odpowiednich testów. Migrację komórek oceniono za pomocą testu „wound-healing” oraz „Transwell” przy użyciu odpowiednich insertów. W przypadku oceny inwazji komórek użyto inserty, które były dodatkowo opłaszczane Matrigel[®] Basement Membrane Matrix (Corning). Wyniki wykazały, że zarówno w przypadku zastosowania testu „wound-healing” jak i „Transwell assay” po zahamowaniu ekspresji BMI-1 dochodzi do zahamowania potencjału migracyjnego komórek HEC-1 oraz Ishikawa (**Ryc. 25A, B, C**). Zaobserwowano również, że zastosowanie PTC-209 istotnie wpływa na spadek inwazji w przypadku obu linii komórkowych (**Ryc. 25D**).

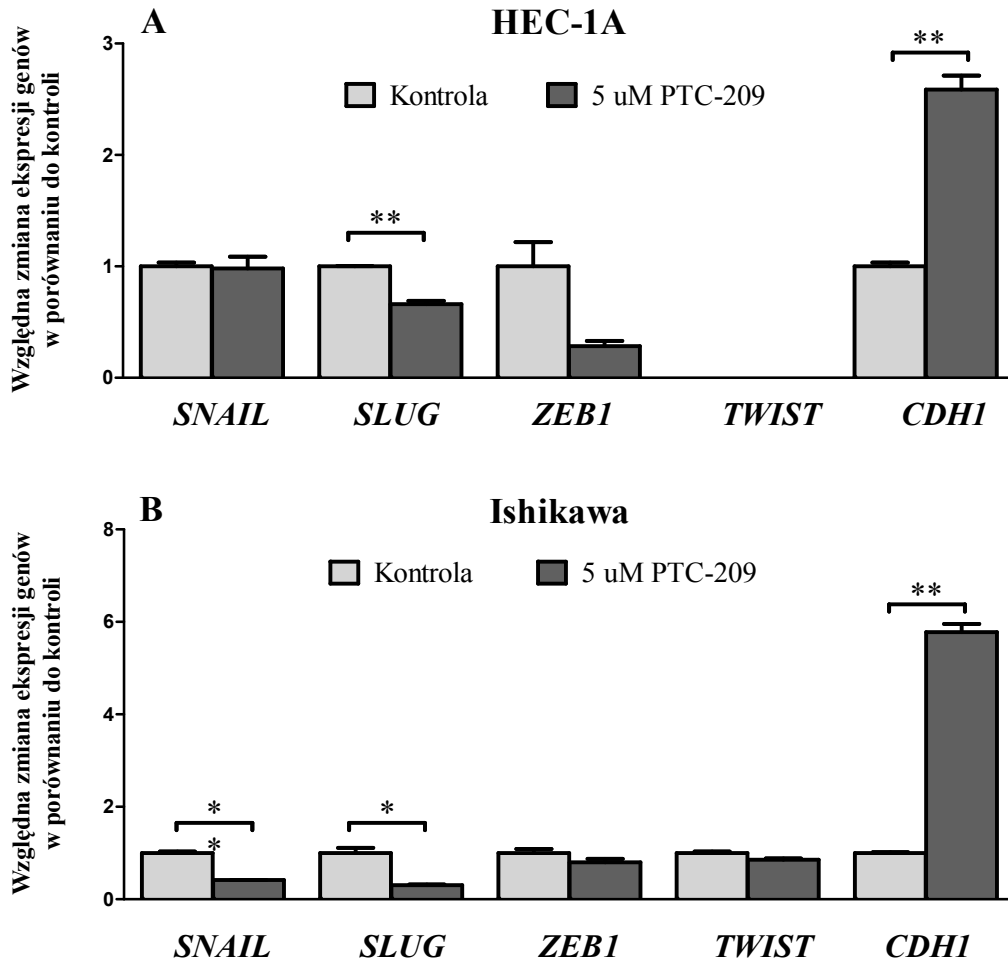


Rycina 25. Analiza potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórek HEC-1A oraz Ishikawa po zastosowaniu PTC-209. Wyniki analizy potencjału migracyjnego komórek HEC-1A (A) oraz Ishikawa (B) po traktowaniu 5μM PTC-209 z wykorzystaniem testu „wound-healing” w czasie 0, 24, 48 godz. oraz testu „Transwell assay” (C). Potencjał inwazyjny komórek oceniano z wykorzystaniem opłaszczonych Matrigelem insertów (D); *** p<0,001.

W wyniku procesu EMT komórki nabłonkowe uzyskują większą zdolność do migracji. Proces ten podczas progresji nowotworowej może wpływać na przekształcenie niezłośliwego nowotworu w formę inwazyjną. Podczas procesu EMT dochodzi do wzrostu ekspresji kilku charakterystycznych markerów dla tego procesu takich jak *SNAIL*, *ZEB1*, *TWIST*, *SLUG* oraz białek zaangażowanych w migrację komórek m.in. wimentyny czy kadheryny N. W wyniku procesu EMT obserwuje się spadek ekspresji białka E-kadheryny kodowanej przez gen *CDH1* (78).

W związku z tym, że BMI-1 może w niektórych typach nowotworów wpływać na ekspresję markerów epitelialnych, określono wpływ zahamowania BMI-1 na ekspresję markerów epiteliano-mezenchymalnych w komórkach HEC-1A oraz Ishikawa.

Wykazano, że zastosowanie inhibitora PTC-209 obniża ekspresję *SLUG* w linii HEC-1A (**Ryc. 26A**), a w linii Ishikawa prowadzi do obniżenia ekspresji *SNAIL* i *SLUG* (**Ryc. 26B**). W przypadku obu linii komórkowych po zastosowaniu PTC-209 zaobserwowano wzrost ekspresji *CDH1* (**Ryc. 26**). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że BMI-1 może być zaangażowane w przejście epitelialno-mezenchymalne komórek raka endometrium, a co za tym idzie w zwiększenie potencjału migracyjnego regulując ekspresję *SLUG*, *SNAIL* i *CDH1*.

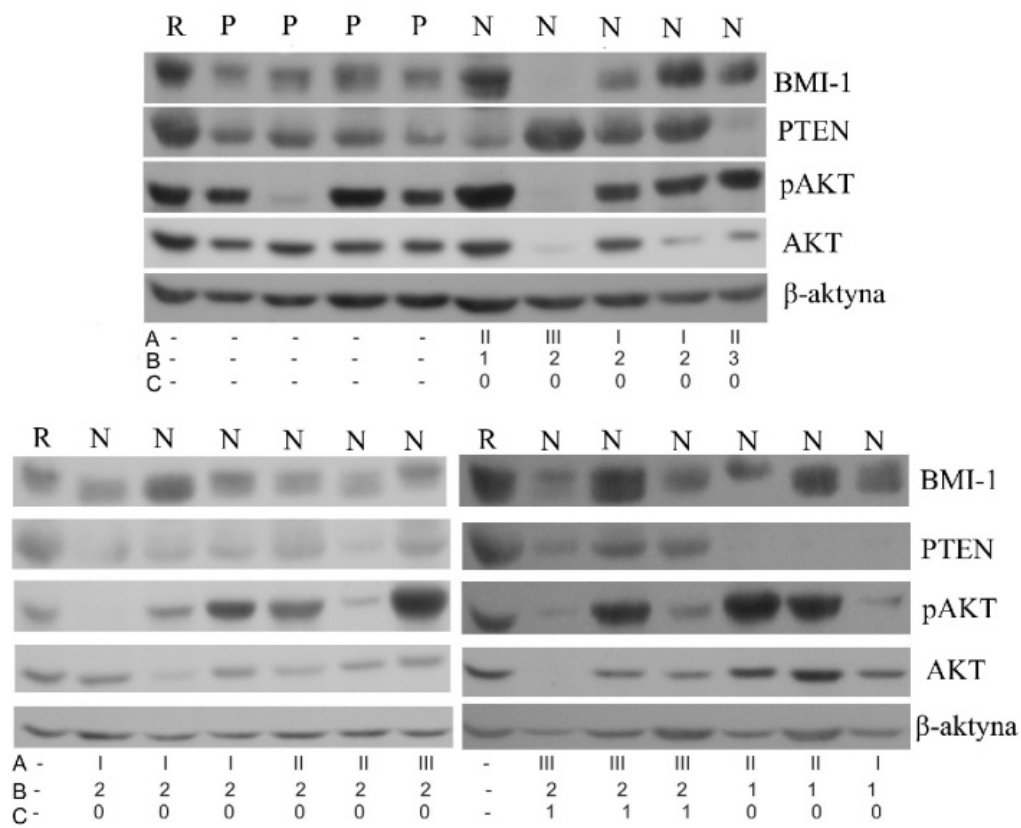


Rysunek 26. Efekt zahamowania ekspresji BMI-1 na ekspresję genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne. Względna ekspresja genów *SNAIL*, *SLUG*, *ZEB1*, *TWIST*, *CDH1* w porównaniu do kontroli 48 godzin po traktowaniu inhibitorem BMI-1 w linii HEC-1A (A) oraz Ishikawa (B); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Wyniki stanowią średnią z trzech powtórzeń.

7.9. Analiza porównawcza ekspresji białek BMI-1 i PTEN oraz poziomu fosforylowanej na Ser473 kinazy AKT w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy

W celu dalszego potwierdzenia zależności pomiędzy BMI-1 a elementami szlaku AKT w raku endometrium dokonano również analizy ekspresji białek BMI-1, PTEN, AKT i poziomu fosforylowanej na serynie 473. formy kinazy AKT w preparatach tkanki prawidłowej endometrium oraz nowotworów endometrium metodą Western blotting. Ekspresję białek w raku endometrium badano również w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*), stopnia złośliwości histologicznej, oceny stopnia naciekania mięśniówki oraz zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania do węzłów chłonnych. Charakterystykę preparatów dla poszczególnych przypadków przedstawia **Tabela 1**. Reprezentatywne wyniki immunodetekcji zostały przedstawione na **Ryc. 27**. Otrzymane wyniki immunodetekcji białek poddano analizie densytometrycznej w programie Gel Pro 3.0 (Media Cybernetics). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie zintegrowanej gęstości optycznej (**IOD**, ang. *Integrated Optical Density*). Wartości gęstości optycznych uzyskanych dla pasm odpowiadających poszczególnym białkom dzielono przez wartość gęstości optycznej uzyskanej dla pasma β -aktyny. Próbkę referencyjną nanoszono podczas każdego rozdziału elektroforetycznego w celu normalizacji wyników ekspresji białek na immunoblotach. Wyniki przedstawiono w **Tabeli 7** jako wartości średnie dla każdej grupy.

Analiza ekspresji białek w preparatach raka błony śluzowej trzonu macicy wykazała spadek ekspresji BMI-1 w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania według klasyfikacji FIGO (III+IV) w stosunku do nowotworów o niższym stopniu zaawansowania (I). Niższą ekspresję BMI-1 stwierdzono również w nowotworach endometrium wykazujących zdolność do przerzutowania do węzłów chłonnych w porównaniu do nowotworów nieprzerzutujących (**Tabela 7**). W przypadku ekspresji PTEN wykazano niższą ekspresję w preparatach nowotworowych w porównaniu do preparatów prawidłowych endometrium (**Tabela 7**). Zaobserwowano również wzrost poziomu fosforylacji kinazy AKT w preparatach nowotworowych w stosunku do preparatów prawidłowych. Poziom fosforylacji na Ser473 był jednak niższy w nowotworach wykazujących przerzuty do węzłów chłonnych w porównaniu do nowotworów nieprzerzutujących (**Tabela 7**). Stwierdzono niższą fosforylację kinazy AKT w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania według klasyfikacji FIGO (III+IV) w porównaniu do nowotworów o niższym stopniu zaawansowania (I) (**Tabela 7**).



Rycina27. Reprezentatywne wyniki ekspresji BMI-1, PTEN, AKT, oraz fosforylacji kinazy AKT w preparatach prawidłowych (P) oraz nowotworowych endometrium (N); R- preparat referencyjny, A- stopień zaawansowania według klasyfikacji FIGO, B- stopień histologicznej złośliwości, C- przerzuty do węzłów chłonnych.

Tabela 7. Porównanie ekspresji białek BMI-1, PTEN, AKT oraz poziomu fosforylacji kinazy AKT w preparatach prawidłowych i nowotworowych raka błony śluzowej trzonu macicy.

Parametry kliniczno- patologiczne	BMI-1		PTEN		AKT		pAKT		pAKT/AKT	
	Średnia±SD	p	Średnia ±SD	p	Średnia ±SD	p	Średnia ±SD	p	Średnia ±SD	p
<i>Preparaty</i>										
<i>Prawidłowe</i>	0.832±0.115	0.606	1.229±0.356	<0.0001	0.629±0.062	0.051	1.795±0.438	0.093	3.059±0.721	0.0029
<i>Nowotworowe</i>	0.752±0.068		0.525±0.105		0.701±0.111		4.208±0.974		17.43±4.683	
<i>Stopień histologicznej złośliwości</i>										
1	1.027±0.190	0.233	0.458±0.092	0.711	0.645±0.164	0.661	4.639±1.085	0.142	5.775±1.344	0.860
2	0.714±0.086		0.628±0.182		0.736±0.176		3.511±0.727		13.91±3.231	
3	0.665±0.131		0.352±0.071		0.674±0.187		2.129±0.688		10.08±3.021	
<i>Stopień zaawansowania wg klasyfikacji FIGO</i>										
I	0.867±0.104	0.0094^a	0.594±0.175	0.866	0.620±0.105	0.386	5.465±1.683	0.0015^b	13.34±2.679	0.073
II	0.826±0.133		0.477±0.188		0.781±0.222		1.845±0.466		7.457±1.806	
III +IV	0.435±0.072		0.408±0.077		0.496±0.134		0.771±0.216		5.952±2.112	
<i>Stopień naciekania mięśniówki</i>										
<1/2	0.623±0.078	0.778	0.338±0,041	0.772	1,712±0,889	0.238	0,235±0,125	0.410	22,460±9,797	0.060
≥1/2	0.549±0.085		0,298±0,034		1,198±1,178		0,457±0,173		13,450±6,440	
<i>Zajęciem węzłów chłonnych</i>										
Nie	0.826±0.078	0.005	0.552±0.128	0.710	0.582±0.087	0.105	4.730±1.158	0.021	5.375±1.086	0.015
Tak	0.393±0.083		0.394±0.107		1.274±0.478		1.695±0.770		2.252 ±0.252	

^aI vs III+IV, II vs III+IV; ^b I vs III+IV, II vs III+IV

7.10. Analiza porównawcza ekspresji genów *PTEN*, *PHLPP1* i *PHLPP2* w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy

Przeprowadzono również analizę ekspresji genów fosfataz zaangażowanych w regulację aktywności kinazy AKT w preparatach raka błony śluzowej trzonu macicy. Analizę ekspresji fosfataz w preparatach prawidłowych endometrium i nowotworów endometrium przeprowadzono z użyciem metody Real Time PCR. Ekspresję wybranych genów w preparatach nowotworów błony śluzowej trzonu macicy zanalizowano również w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO (ang. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*), stopnia złośliwości histologicznej, oceny stopnia naciekania mięśniówki oraz zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania do węzłów chłonnych. Liczbę pacjentów w poszczególnych grupach przedstawia **Tabela 1**. Względna ekspresja *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* została przedstawiona jako liczba kopii mRNA badanego genu na 1000 kopii mRNA *HPRT1*. Wyniki analizy ekspresji badanych genów na poziomie mRNA przedstawia **Tabela 8**.

Analiza ekspresji wykazała spadek ekspresji *PTEN* w preparatach o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (G3) w porównaniu do preparatów o niższym stopniu histologicznej złośliwości (G2). Wykazano również niższą ekspresję *PTEN* w preparatach o wyższym stopniu zaawansowania według klasyfikacji FIGO (II) w stosunku do preparatów o niższym stopniu (I). Ekspresja *PHLPP2* była niższa w preparatach nowotworowych w porównaniu z preparatami prawidłowymi endometrium (**Tabela 8**).

Tabela 8. Porównanie ekspresji *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2* w preparatach prawidłowych i nowotworowych raka błony śluzowej trzonu macicy.

Parametrykliczno- patologiczne	<i>PTEN</i>		<i>PHLPP1</i>		<i>PHLPP2</i>	
	Średnia±SD	p	Średnia ±SD	p	Średnia ±SD	p
Preparaty						
<i>Prawidłowe</i>	8941±1319	0,051	7279±1257	0,135	885,0±189,9	0,039
<i>Nowotworowe</i>	11681±2557		5803±690,3		526,4±76,33	
Stopień histologicznej złośliwości						
1	7011±1865	0,013^a	5946±1392	0,807	540,3±186,6	0,509
2	12514 ±3106		6198±1005		538,6±106,3	
3	3465±843,3		4520±951,3		478,5±118,5	
Stopień zaawansowania według klasyfikacji FIGO						
I	7632±1124	0,012^b	6951±1002	0,091	602,4±108,9	0,284
II	2820±645,5		3873±851,7		317,8±62,4	
III +IV	5458± 1523		4784±1592		557,2±213,4	
Stopień naciekania mięśniówki						
<1/2						
≥1/2	6896±1699	0,280	7146±1110	0,069	525,4±92,30	0,254
	5057±1056		4666±831,5		527,3±118,4	
Zajęcie węzłów chłonnych						
Nie	11400±2775	0,905	5862±738,0	0,425	507,2±77,7	0,950
Tak	6554±1949		5474±2003		633,1±262,2	

^a2 vs3; ^bI vs II

7.11. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją BMI-1, PTEN, PHLPP1, PHLPP2 oraz fosforylacją kinazy AKT w preparatach tkanek prawidłowych i raka błony śluzowej trzonu macicy

Ze względu na występowanie zależności pomiędzy ekspresją BMI-1, fosforylacją AKT oraz ekspresją genów kodujących fosfatazy *PHLPP* w komórkach HEC-1A i Ishikawaprzeprowadzono analizę korelacji pomiędzy poszczególnymi elementami szlaku AKT w preparatach klinicznych. Preparaty nowotworowe endometrium podzielono na dwie grupy ze względu na występowanie PTEN (PTEN+) lub brak jego ekspresji (PTEN-) oraz ze względu na zajęcie (+) lub brak (-) zajęcia węzłów chłonnych. Współczynnik korelacji rang Spearmana wykorzystano w celu określenia siły i kierunku korelacji.

Analiza korelacji nie wykazała zależności pomiędzy BMI-1 a PTEN. Wykazano natomiast dodatnią korelację pomiędzy BMI-1 a poziomem fosforylacji kinazy AKT zarówno w preparatach prawidłowych, jak i nowotworowych błony śluzowej endometrium. Ujemną korelację pomiędzy PTEN, a fosforylacją kinazy AKT zaobserwowano jedynie w preparatach nowotworowych w pierwszym stopniu zaawansowania według klasyfikacji FIGO oraz preparatach nie wykazujących przerzutów do węzłów chłonnych. Odwrotną zależność pomiędzy BMI-1 a *PHLPP1* i *PHLPP2* stwierdzono w preparatach prawidłowych oraz w preparatach nowotworowych wykazujących ekspresję PTEN (**Tabela 9**). Wyniki badań sugerują, że BMI-1 ma związek z ekspresją izoform PHLPP w komórkach raka endometrium, ale głównie w komórkach wykazujących ekspresję PTEN.

Tabela 9. Analiza korelacji pomiędzy BMI-1, PTEN, pAKT i PHLPP1/2.

Parametry	BMI-1/PTEN		BMI-1/pAKT		PTEN/pAKT		BMI-1/PHLPP1		BMI-1/PHLPP2	
	Spearman r	p	Spearman r	p	Spearman r	p	Spearman r	p	Spearman r	p
<i>Prawidłowe</i>	0.129	0.473	0.598	<u>0.0002</u>	-0.018	0.919	-0.622	<u><0.001</u>	-0.556	<u><0.001</u>
<i>Nowotworowe</i>	-0.165	0.152	0.559	<u>< 0.0001</u>	-0.370	<u>0.001</u>	-0.098	0.413	-0.089	0.452
<i>Nowotworowe PTEN+</i>	-0.237	0.117	0.580	<u>< 0.0001</u>	-0.291	0.052	-0.339	<u>0.023</u>	-0.396	<u>0.007</u>
<i>Nowotworowe PTEN-</i>	-	-	0.440	<u>0.0021</u>	-	-	-0.146	0.442	-0.034	0.856
<i>Stadium wg FIGO I</i>	-0.092	0.559	0.623	<u>< 0.0001</u>	-0.403	<u>0.008</u>	-0.230	0.146	-0.155	0.337
<i>Stadium wg FIGO II-IV</i>	-0.255	0.145	0.437	<u>0.0097</u>	-0.296	0.089	0.002	0.991	-0.038	0.837
<i>Zajęcie węzłów chłonnych-</i>	-0.173	0.176	0.506	<u><0.0001</u>	-0.384	<u>0.002</u>	-0.206	0.114	-0.137	0.294
<i>Zajęcie węzłów chłonnych +</i>	-0.200	0.493	0.665	<u>0.0093</u>	-0.481	0.081	0.273	0.391	0.111	0.729

8. Dyskusja

Ważnym przekaźnikiem sygnału w komórkach jest serynowo-treoninowakinaza AKT, która wpływa na regulację proliferacji i metabolizmu komórek. Kinaza AKT jest aktywowana w wyniku stymulacji komórek cytokinami, czynnikami wzrostu czy insuliną. Czynniki te aktywują receptory o aktywności kinaz tyrozynowych, co przyczynia się do rekrutacji do błony komórkowej 3-kinazy fosfatydoinooytolo (PI3K, ang. *phosphoinositide 3-kinase*), która przekształca fosfatydoinooytolo-4,5-bisfosforan (PIP2, ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) do fosfatydoinooytolo-3,4,5-trisfosforanu (PIP3, ang. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). W wyniku tego dochodzi do aktywacji kinazy AKT poprzez jej fosforylację na Thr308 oraz Ser472 lub 473 w zależności od rodzaju izoformy AKT. Negatywnymi regulatorami kinazy AKT są fosfatazy, które w sposób pośredni lub bezpośredni regulują jej aktywność. Fosfataza PTEN wpływa na defosforylację PIP3 do PIP2, przez co dochodzi do zahamowania aktywności kinazy AKT (20). Fosfatazami, które wpływają na bezpośrednią defosforylację kinazy AKT są fosfatazy PP2A i PHLPP.

Komórki nowotworowe często wykazują wzrost aktywności kinazy AKT, co przyczynia się do proliferacji komórek oraz progresji nowotworów poprzez hamowanie apoptozy i regulację zdolności komórek nowotworowych do migracji i inwazji (122). Zwiększona aktywność szlaku PI3K/AKT stwierdzona w wielu ludzkich nowotworach może być wynikiem nadekspresji receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, utraty katalitycznej funkcji PTEN, a także amplifikacji lub mutacji w genach PI3K lub AKT. Zaburzenia w szlaku PI3K/AKT są jedną z najlepiej poznanych nieprawidłowości w raku endometrium (162). Sugeruje się, że niska ekspresja PTEN, negatywnego regulatora szlaku AKT, może być zaangażowana w powstawanie i rozwój raka endometrium (62).

Zwiększoną ekspresję białka BMI-1 obserwuje się w wielu typach ludzkich nowotworów, w tym raku płuc, raku jajnika czy ostrej białaczce szpikowej. Zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro* potwierdzają, że białko BMI-1 jest zaangażowane w proces inicjacji nowotworzenia, ale także inwazji, metastazy oraz oporności na leczenie (102, 280). Wyniki badań Song i wsp. (2009) (203) sugerują, że białko BMI-1 może odgrywać znaczącą rolę w regulacji aktywności kinazy AKT w raku jamy nosowo-gardłowej poprzez przyłączenie się do promotora genu *PTEN* w wyniku czego, dochodzi do zahamowania jego ekspresji i wzrostu aktywności kinazy AKT (203).

Pomimo tego, że zaburzenia szlaku kinazy AKT są dość powszechne w przypadku nowotworów endometrium, rola białka BMI-1 w regulacji aktywności AKT w komórkach raka endometrium nie jest znana. Ponadto, chociaż w niektórych typach komórek, np. komórkach macierzystych raka trzustki negatywna regulacja PTEN przez BMI-1 jest główną przyczyną aktywacji szlaku AKT (235), nieznanym jest wpływ BMI-1 na szlak AKT w komórkach nie wykazujących ekspresji PTEN.

W związku z tym w ramach przedstawionej pracy doktorskiej przeprowadzono badania mające na celu określenie udziału białka BMI-1 w regulacji fosforylacji AKT w komórkach raka endometrium HEC-1A i Ishikawa, różniących się ekspresją PTEN. W komórkach Ishikawa nie obserwuje się ekspresji białka PTEN (**Ryc. 8**). Wan i wsp. (2007) wykazali, że ekspresja PTEN w linii komórkowej na poziomie transkryptu jest wysoka, ale z powodu mutacji dochodzi do utworzenia kodonu STOP i zahamowania translacji białka (227).

W komórkach HEC-1A i Ishikawa wyciszano ekspresję *BMI-1* stosując metodę interferencji RNA lub hamując ekspresję białka BMI-1 związkiem PTC-209 (**Ryc. 7, 9, 10**). Uzyskane wyniki wykazały, że wyciszenie *BMI-1* metodą interferencji RNA wpływa na obniżenie poziomu zarówno transkryptu jak i białka (**Ryc. 7**). Zastosowanie PTC-209, hamuje proces translacji i obniżenie ekspresji obserwujemy jedynie na poziomie białka (**Ryc. 10**). PTC-209 wpływa na wzrost ekspresji *BMI-1* na poziomie mRNA, co może świadczyć o istnieniu mechanizmu ścisłej regulacji ekspresji tego genu. Spadek ekspresji białka może stanowić sygnał, do uruchomienia przez komórkę mechanizmu wpływającego na aktywację transkrypcji. Podobny efekt po zastosowaniu PTC-209 zaobserwowali Mayr i wsp. (2016) w komórkach raka dróg żółciowych (165). Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie PTC-209 jest równie skuteczne w obniżaniu ilości białka BMI-1 jak interferencja.

W wyniku zmniejszenia poziomu BMI-1 po zastosowaniu obu metod dochodzi do wyraźnego wzrostu ekspresji genów fosfataz *PHLPP1* i *PHLPP2* w komórkach raka endometrium (**Ryc. 9, 11**). W literaturze biochemicznej do tej pory nie było doniesień wiążących BMI-1 z ekspresją fosfataz PHLPP1 i 2, dla których mechanizm regulacji ekspresji nie jest znany. W przypadku wyciszenia i zahamowania ekspresji BMI-1 dochodzi również do spadku poziomu fosforylacji AKT zarówno w komórkach HEC-1A jak i Ishikawa (**Ryc. 7, 12**), co sugeruje że BMI-1 może wpływać na fosforylację kinazy AKT nie tylko poprzez regulację PTEN, ale również genów fosfataz PHLPP. Molin i wsp.(2011) (167), badając rolę PTEN i PHLPP w komórkach glejaka stwierdzili, że zahamowanie ekspresji obu fosfataz bardzo wyraźnie wpływało na wzrost aktywności kinazy AKT natomiast zahamowanie jedynie PTEN czy PHLPP nie powodowało takiego efektu (167). Jednak w komórkach nie

wykazujących w ogóle ekspresji PTEN rola PHLPP1 była bardziej wyraźna i utrata tej fosfatazy zdecydowanie wpływała na wzrost fosforylacji AKT. Zatem wydaje się, że w komórkach raka endometrium nie wykazujących ekspresji białka PTEN, te fosfatazy mogą odgrywać szczególną rolę w regulacji aktywności AKT.

Aby stwierdzić czy wpływ BMI-1 na poziom PHLPP wynika bezpośrednio z regulacji transkrypcji genów fosfataz PHLPP określono czy BMI-1 lokalizuje się w ich miejscach promotorowych do czego wykorzystano metodę immunoprecypitacji chromatyny. Analiza wykazała, że BMI-1 w obu liniach komórkowych może przyłączać się do regionów promotorowych *PHLPP1* oraz *PHLPP2* i prawdopodobnie bezpośrednio wpływać na regulację ich ekspresji (**Ryc. 13**).

Badania epidemiologiczne wykazują, że otyłość, hiperglikemia i hiperinsulinemia są istotnymi czynnikami ryzyka występowania nowotworów piersi i endometrium (210). Insulinooporność jest charakterystyczną cechą zespołu metabolicznego, którego występowanie jest związane z nowotworami o większym stopniu zaawansowania i gorszymi rokowaniami wśród pacjentek z rakiem piersi i endometrium (171). Wykazano, że insulinooporność koreluje ze stopniem zaawansowania raka błony śluzowej trzonu macicy według klasyfikacji FIGO, a także z obecnością przerzutów (15).

Szlak insulina/IGF-1 jest czynnikiem łączącym zespół metaboliczny z procesem nowotworzenia (23). Insulina wiąże się z receptorami o aktywności kinaz tyrozynowych, głównie w hepatocytach, adipocytach i komórkach mięśniowych. Jednak wysoką ekspresję receptora insulinowego obserwuje się również w tkankach macicy i piersi (64, 192). Insulina i IGF-1 są zaangażowane w regulację przede wszystkim wzrostu, proliferacji, metabolizmu glukozy, różnicowania oraz apoptozy komórek (23). Insulina i IGF-1 stymulują receptor o aktywności kinazy tyrozynowej, który może aktywować szlak kinazy AKT.

Stwierdzono, że mutacje w genie *PTEN*, prowadzące do spadku lub braku ekspresji białka PTEN wpływają na wzrost wrażliwości na insulinę w komórkach tłuszczowych i mięśniowych oraz komórek beta wysp trzustkowych (33, 120). Zatem zwiększona ekspresja PTEN negatywnie wpływa na wrażliwość na insulinę i może prowadzić do insulinooporności (139). Wynikający z tego wysoki poziom insuliny we krwi może z kolei wpływać na stymulację receptora insulinowego w innych tkankach, w tym np. endometrium (127). Zmiany w ekspresji PHLPP są również obserwowane w mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej u osób cierpiących na cukrzycę (3, 44). Sugeruje się, że insulina wpływa na zahamowanie ekspresji PHLPP, przez co zwiększona jest aktywność AKT. Potwierdziły to badania Caricilli i wsp. (2012) którzy wykazali, że zwiększona ekspresja PHLPP1 u otyłych

myszki prowadziła do zmniejszonej wrażliwości na insulinę (27). Ponadto, Xiong i wsp. (2017) wykazali, że zahamowanie ekspresji PHLPP zwiększyło tempo metabolizmu glukozy oraz zwiększało produkcję mleczanu w komórkach raka jelita grubego SW480, DLD1, Caco2. Wykazano, że fosfatazy PHLPP wpływają na glikolizę w raku jelita grubego poprzez regulację fosforylacji kinazy AKT oraz kinazy HK2 (259).

Ostatnie badania sugerują, że białko BMI-1 może mieć istotny związek z insulinoopornością i regulacją szlaku insuliny. Cannon i wsp. (2014) stwierdzili istnienie negatywnej korelacji pomiędzy poziomem BMI-1, a wrażliwością na insulinę w komórkach wątroby i mięśni myszy (25). Mechanizm, przez który hiperglikemia oraz insulinooporność wpływają na rozwój i progresję nowotworów jest dość słabo poznany (14). Dlatego istotnym wydaje się określenie zależnego od stężenia glukozy i insuliny związku pomiędzy BMI-1 a szlakiem kinazy AKT w komórkach nowotworowych. Duan i wsp. (2019) wykazali, że ekspresja BMI-1 może wzrastać pod wpływem wysokiego stężenia glukozy w komórkach raka trzustki PANC-1 i SW1990 (55). W przeciwieństwie do wyników Duan i wsp. (2019) w komórkach raka endometrium HEC-1A hodowanych w warunkach hiperglikemii zaobserwowano niższą ekspresję BMI-1 w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach hipoglikemii. Natomiast w przypadku linii komórkowej Ishikawa nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji BMI-1 w zależności od stężenia glukozy (**Ryc. 15**). Stężenie glukozy istotnie wpływa na ekspresję *PTEN*, *PHLPP1* w linii HEC-1A oraz *PHLPP1* w linii Ishikawa. Ekspresja tych genów była niższa w warunkach hiperglikemii niż hipoglikemii (**Ryc. 14**). Jest to odwrotny wynik niż w przypadku badań Liu i wsp. (2011) którzy wykazali, że niskie stężenie glukozy lub aminokwasów istotnie wpływa na spadek ekspresji PHLPP w komórkach raka jelita SW480 (143).

Po zahamowaniu ekspresji BMI-1 w obu typach badanych komórek raka endometrium w warunkach hipoglikemii zaobserwowano bardzo wyraźny spadek ekspresji *PHLPP1*, a z kolei w warunkach hiperglikemii wzrost ekspresji *PHLPP1* i *PHLPP2* (**Ryc. 16**). Sugeruje to, że BMI-1 może istotnie wpływać na zależną od glukozy regulację ekspresji izoform PHLPP.

Wykazano, że stymulacja komórek HEC-1A insuliną powoduje początkowo wzrost ekspresji BMI-1 a następnie spadek zarówno w warunkach hipo-, jak i hiperglikemii. Zmiany ekspresji BMI-1 pokrywają się ze zmianami fosforylacji AKT, a obniżonej ekspresji BMI-1 po przedłużonej stymulacji insuliną w warunkach hipoglikemii towarzyszy wzrost ekspresji *PTEN* (**Ryc. 18A**). Zahamowanie ekspresji BMI-1 sprawia, że komórki szybciej stają się niewrażliwe na działanie insuliny szczególnie w warunkach hipoglikemii. W przeciwieństwie

do tego w komórkach Ishikawa zahamowanie ekspresji BMI-1 sprawia, że komórki są bardziej wrażliwe na stymulację insuliną zarówno w warunkach hipoglikemii jak i hiperglikemii (**Ryc. 18B**). Otrzymane wyniki wykazały, że BMI-1 może odgrywać również istotną rolę we wrażliwości komórek raka endometrium na działanie insuliny, choć pełne zrozumienie mechanizmu tej zależności wymaga dalszych badań.

Dane literaturowe wskazują, że w przypadku niektórych nowotworów hiperglikemia wpływa na wzrost ekspresji BMI-1, a przez to na zwiększenie żywotności i proliferacji komórek nowotworowych (55). W przypadku komórek HEC-1A i Ishikawa żywotność komórek jest wyższa w warunkach hiperglikemii niż hipoglikemii, choć jak wcześniej stwierdzono ekspresja BMI-1 w warunkach niedostatecznej ilości glukozy jest wyższa. Może jednak to być mechanizm obronny komórek umożliwiający im przetrwanie w niekorzystnych warunkach. W przedstawionej pracy, wykazano, że BMI-1 wpływa na żywotność i proliferację obu linii komórkowych raka endometrium zarówno w warunkach hipoglikemii jak i hiperglikemii. Wydaje się, że wpływ BMI-1 na żywotność komórek jest bardziej znaczący w warunkach hipoglikemii w komórkach HEC-1A, a w komórkach Ishikawa w warunkach hiperglikemii (**Ryc. 24**).

Zmiany w ekspresji BMI-1 wpływają na nieprawidłową ekspresję genów kontrolujących podział, proliferację, migrację czy inwazję komórek nowotworowych, co prowadzi do rozwoju i progresji nowotworowej (26). Pomimo tego, że BMI-1 jest uznanym onkogenem wpływającym na transformację nowotworową, jego rola w metastazie i inwazji nie są w pełni poznane. BMI-1 promuje inwazję i migrację komórek raka trzustki i raka wątrobowokomórkowego (131, 235). Jednak Xiong i wsp. (2015) wykazali, że w komórkach raka płuc niska ekspresja BMI-1 wpływa na proces metastazy komórek (257). Z kolei Engelsen i wsp. (2008) wykazali, że brak lub niska ekspresja BMI-1 koreluje z obecnością inwazji naczyniowej oraz złymi rokowaniami wśród pacjentek z rakiem endometrium (59). Ponadto Shao i wsp. (2014) sugerują, że nadekspresja BMI-1 wpływa na lepsze rokowania wśród pacjentek rasy białej cierpiących na raka piersi (199). Zatem, najprawdopodobniej rola BMI-1 w metastazie i inwazji może zależeć od rodzaju nowotworu i kontekstu molekularnego.

Wykazano, że zahamowanie ekspresji w komórkach raka jamy nosowo gardłowej i czerniaka wpływało na hamowanie przejścia epitelialno-mezenchymalnego tych komórek (150, 203). Przejście epitelialno-mezenchymalne to złożony proces, w którym komórki nabłonkowe uzyskują większą zdolność do migracji i nabywają przez to cech inwazyjnych komórek mezenchymalnych. Proces ten podczas progresji nowotworowej może wpływać na

przekształcenie niezłośliwego nowotworu w formę inwazyjną. Podczas procesu EMT dochodzi do wzrostu ekspresji kilku charakterystycznych markerów dla tego procesu będących czynnikami transkrypcyjnymi, takich jak *SNAIL*, *ZEB1*, *TWIST*, *SLUG* oraz białek zaangażowanych w migrację komórek m.in. wimentyny czy kadheryny N. W wyniku procesu EMT obserwuje się spadek ekspresji białka E-kadheryny kodowanej przez gen *CDH1* (78). Song i wsp. (2009) wykazali, że BMI-1 wraz z SNAIL przyłączając się do regionu promotorowego *CDH1* wpływa na obniżenie ekspresji E-kadheryny i wzrost inwazyjności raka jamy nosowo-gardłowej (203). W nowotworach głowy i szyi BMI-1 wpływa także na regulację ekspresji SNAIL (277). W komórkach raka gruczołowo-torbielowatego ślinianek SACC-LM po wyciszeniu ekspresji BMI-1 zaobserwowano spadek ekspresji SNAIL, SLUG i wzrost ekspresji E-kadheryny, a także spadek potencjału migracyjnego i inwazyjnego tych komórek (28). Yang i wsp. (2010) wykazali, że wysoka ekspresja BMI-1 i TWIST1 koreluje ze spadkiem ekspresji E-kadheryny oraz gorszymi rokowaniami wśród pacjentów z nowotworami głowy i szyi (269). Kurihara i wsp. (2015) wykazali, że w nowotworze języka BMI-1 wraz z ZEB1 może regulować ekspresję E-kadheryny przez co wpływać na inicjację przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek (124).

W komórkach nowotworach endometrium SNAIL i SLUG odgrywają istotną rolę w przejściu epitelialno-mezenchymalnym poprzez hamowanie ekspresji genu dla E-kadheryny (213). Stwierdzono, że w preparatach raka endometrium ekspresja SNAIL, SLUG jest zdecydowanie wyższa niż w preparatach prawidłowego endometrium. Wzrost ekspresji tych czynników istotnie korelował ze stopniem zaawansowania nowotworu endometrium oraz występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych (213). Wyniki uzyskane w toku realizacji przedstawionej pracy doktorskiej sugerują, że BMI-1 może odgrywać również istotną rolę w regulacji przejścia epitelialno-mezenchymalnego w komórkach raka endometrium HEC-1A i Ishikawa poprzez regulację ekspresji *SNAIL*, *SLUG* i *CDH1*, ponieważ zahamowanie jego ekspresji wyraźnie zwiększa ekspresję SNAIL i SLUG oraz zmniejsza ekspresję E-kadheryny (**Ryc. 26**). Ponadto, wykazano, że obniżenie ekspresji BMI-1 może zmniejszać potencjał migracyjny i inwazyjny komórek raka endometrium (**Ryc. 25**).

W celu dalszego potwierdzenia zależności pomiędzy BMI-1 a elementami szlaku AKT w raku endometrium dokonano analizy ekspresji BMI-1, PTEN, *PHLLP1/2*, AKT i poziomu fosforylowanej formy kinazy AKT, zarówno w preparatach tkanki prawidłowej endometrium, jak i nowotworów endometrium. Uzyskane wyniki dla preparatów nowotworowych analizowano również pod kątem zależności wysokości ekspresji od stopnia zaawansowania nowotworu według klasyfikacji FIGO, stopnia histologicznej złośliwości, naciekania

mięśniówki macicy oraz zajęcia węzłów chłonnych (**Ryc. 27, Tab. 7**). Dostępne dane literaturowe wskazują, że większość nowotworów wykazuje nadekspresję BMI-1, która wpływa na wzrost ich inwazyjności. Nadekspresję białka BMI-1 obserwuje się w glejaku, rdzeniaku, raku jamy nosowo-gardłowej, raku języka, piersi, jelita grubego, jajnika, pęcherza moczowego i trzustki (280). Jednak wykazano, że brak lub niska ekspresja w przypadku niektórych nowotworów jest charakterystyczna dla nowotworów o wyższym stopniu zaawansowania. Engelsen i wsp. (2008) wykazali w preparatach błony śluzowej trzonu macicy obniżoną ekspresję BMI-1 w guzach zdolnych do inwazji naczyniowej i guzach o wysokim stopniu histologicznej złośliwości (59).

W prezentowanej pracy nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy ekspresją BMI-1 w preparatach prawidłowych i nowotworowych. Wcześniejsze badania Honiga i wsp. wykazały zwiększoną ekspresję BMI-1 w nowotworach endometrium w porównaniu z tkanką prawidłową. Jednak analizę przeprowadzono jedynie na 12 preparatach nowotworowych i 6 preparatach prawidłowych endometrium (94). Z kolei w prezentowanej pracy podobnie jak w przypadku badań Engelsena i wsp. (2008) stwierdzono obniżoną ekspresję BMI-1 w nowotworach endometrium o wyższym stopniu zaawansowania (III+IV) według klasyfikacji FIGO w stosunku do nowotworów o mniejszym stopniu zaawansowania (I+II) oraz nowotworach wykazujących zdolność do przerzutowania do węzłów chłonnych w porównaniu do nowotworów nieprzerzutujących (**Tab. 7**).

W wielu nowotworach obserwuje się spadek ekspresji genów kodujących fosfatazy PTEN i PHLPP. Jednak wyniki dotyczące wpływu ekspresji PTEN na progresję nowotworów i prognozę dla pacjentów są niejednoznaczne. Wyniki wielu badań sugerują, że brak lub niska ekspresja PTEN wiąże się z gorszymi prognozami dla pacjentów (9, 97, 216) podczas gdy inne wskazują, że brak ekspresji PTEN jest związany z lepszymi prognozami (1, 68, 194). Gao i wsp. (2009) stwierdzili, że poziom ekspresji PTEN u pacjentek z rakiem endometrium był znacząco skorelowany ze stopniem złośliwości histologicznej. Ekspresja PTEN była znacząco wyższa w nowotworach dobrze zróżnicowanych niż nowotworach słabo zróżnicowanych (68).

Ze względu na zdolność hamowania aktywności szlaku AKT odpowiadającego za przeżycie i proliferację komórek, PHLPP1 i 2 uznane zostały za supresory nowotworów. Faktycznie ekspresja obu genów jest niższa w przypadku kilku typów nowotworów np. piersi, jelita grubego, płuc, wątroby i trzustki w porównaniu do tkanki prawidłowej (75, 164). Dane literaturowe wskazują obniżoną ekspresję PHLPP2 w raku płaskonabłonkowym gardła w późnych stadiach zaawansowania nowotworów (239).

Wyniki badań realizowanych w ramach tej pracy wykazały znacznie niższą ekspresję PTEN i PHLPP2 w preparatach raka endometrium w porównaniu do preparatów prawidłowego endometrium. Nie stwierdzono jednak różnic w ekspresji tych białek w preparatach różniących się stopniem złośliwości histologicznej czy zaawansowania klinicznego nowotworu.

Wyniki badań Gungorduk i wsp. (2014) wykazały wzrost poziomu fosforylacji kinazy AKT w raku błony śluzowej trzonu macicy, który korelował z wyższym stopniem histologicznej złośliwości i wyższym stopniem zaawansowania FIGO (III+IV), a także naciekaniem mięśniówki i zajęciem węzłów chłonnych (79). Wyniki badań uzyskane w tej pracy wskazują na zwiększoną fosforylację kinazy AKT w preparatach nowotworowych w porównaniu do prawidłowych, ale w przeciwieństwie do Gungorduk i wsp. (2014) wykazano spadek poziomu fosforylacji kinazy AKT w nowotworach endometrium zdolnych do przerzutowania do węzłów chłonnych w stosunku do nowotworów nieprzerzutujących.

Biorąc pod uwagę, że BMI-1 i AKT pełnią funkcję onkogenów, wydałoby się, że zmniejszona ekspresja BMI-1 i aktywacja szlaku kinazy AKT mogą wpływać na zahamowanie metastazy nowotworów. Jednak wyniki kilku badań, sugerują, że aktywacja kinazy AKT może sprzyjać powstawaniu nowotworów, lecz hamuje inwazyjny potencjał guza. Zatem niski poziom fosforylacji AKT, paradoksalnie może sprzyjać przerzutom (92, 170, 217, 276). Poza tym wpływ AKT na progresję nowotworów może zależeć od rodzaju izoformy AKT. Zwiększona aktywność AKT1 jest charakterystyczna dla wczesnego etapu rozwoju nowotworu i wpływa na ekspresję genów kodujących cyklinę D1 białko S6 czy β -integrynę, a więc zaangażowanych głównie w proliferację. Stwierdzono natomiast, że zwiększona aktywność AKT1 wpływa hamująco na metastazę (190).

Zatem uzyskane wyniki badań sugerują, że obniżona ekspresja PTEN i podwyższony poziom fosforylacji AKT występują prawdopodobnie we wczesnym stadium raka endometrium, podczas niski poziom fosforylacji AKT może być związany z przerzutowaniem raka endometrium.

Niski poziom BMI-1 w nowotworach bardziej agresywnych wydaje się sprzeczny z wynikami uzyskanymi w badaniach przeprowadzonych na komórkach HEC-1A oraz Ishikawa, gdzie wykazano, że zahamowanie ekspresji BMI-1 wpływa na spadek potencjału migracyjnego i inwazyjnego nowotworu endometrium. Należy jednak uwzględnić, że komórki Ishikawa i HEC-1A są modelem komórkowym wywodzącym się z nowotworów endometrium dobrze zróżnicowanych, o niskim stopniu zaawansowania (119). Możliwe, że komórki takie są

bardziej zależne od BMI-1. W komórkach bardziej agresywnych może dochodzić do innych zmian molekularnych, które wpływają na ich potencjał metastatyczny.

W celu określenia zależności pomiędzy poszczególnymi elementami szlaku AKT w raku endometrium przeprowadzono analizę korelacji. Uzyskane wyniki badań nie wykazały żadnej zależności pomiędzy BMI-1 a PTEN, jednak wykazano dodatnią korelację pomiędzy BMI-1 a fosforylacją kinazy AKT. Słabą ujemną korelację stwierdzono pomiędzy PTEN a pAKT w preparatach raka endometrium, ale nie w preparatach prawidłowego endometrium (**Tab. 9**). W związku z tym, że nie zaobserwowano korelacji pomiędzy BMI-1, a PTEN, określono korelację pomiędzy BMI-1 a *PHLPP1* i *PHLPP2*. Wykazano odwrotną korelację pomiędzy BMI-1 a fosfatazami *PHLPP* w tkance prawidłowej endometrium. W przypadku preparatów nowotworowych endometrium ujemną korelację pomiędzy BMI-1 a fosfatazami *PHLPP* stwierdzono tylko w preparatach wykazujących ekspresję PTEN (**Tab. 9**).

Wyniki analizy sugerują, że w raku endometrium BMI-1 reguluje aktywność kinazy AKT nie tylko przez bezpośredni wpływ na PTEN, ale także regulacja ta może zachodzić poprzez izoformy *PHLPP*. Biorąc pod uwagę, że korelacja pomiędzy BMI-1 a *PHLPP1/2* w przypadku nowotworów obserwowana jest tylko w preparatach wykazujących ekspresję PTEN, można sugerować, że być może konieczne jest jednak współdziałanie obu białek w regulacji fosfataz *PHLPP*.

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły istotnych informacji na temat zależności pomiędzy BMI-1, *PHLPP* i PTEN oraz aktywności kinazy AKT w raku endometrium. Po raz pierwszy wykazano, że BMI-1 może regulować ekspresję fosfataz *PHLPP*, a regulacja ta jest zależna od stężenia glukozy i insuliny. Wydaje się więc, że BMI-1 może odgrywać rolę czynnika, który łączy hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem i progresją raka endometrium, choć jego działanie zależy od kontekstu molekularnego.

Ocena ekspresji BMI-1, PTEN, *PHLPP* oraz aktywności kinazy AKT może odgrywać istotną rolę w doborze odpowiedniego leczenia u pacjentek z rakiem endometrium, szczególnie tych, u których stwierdza się cukrzycę. Uzyskane wyniki badań sugerują, że leki oparte na negatywnej regulacji BMI-1, takie jak PTC-209, który obecnie jest fazy badań klinicznych i jest stosowany u pacjentów z guzami litymi (NCT02404480), muszą być stosowane po uwzględnieniu szerszego tła molekularnego

Zatem poznanie zależności pomiędzy hiperinsulinemią, szlakiem kinazy AKT oraz BMI-1 w przyszłości może pozwolić na opracowanie skuteczniejszych metod terapeutycznych, które uwzględniałyby molekularny kontekst i specyfikę nowotworów endometrium oraz

wykazywałyby większa skuteczność w przypadku współistnienia u pacjentów zespołu metabolicznego.

9. Wnioski

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki wykazały, że:

1. W komórkach raka endometrium BMI-1 może wpływać na fosforylację AKT poprzez bezpośrednią regulację ekspresji genów *PTEN*, *PHLPP1*, *PHLPP2*.
2. Ekspresja BMI1 jest zależna od stężenia glukozy i insuliny głównie w komórkach HEC-1A wykazujących ekspresję PTEN.
3. W warunkach hiperglikemii BMI-1 może wpływać na aktywność AKT poprzez regulację fosfataz PHLPP1 i 2, natomiast w warunkach hipoglikemii w komórkach wykazujących ekspresję PTEN głównie przez regulację tej fosfatazy.
4. BMI-1 wpływa na proliferację oraz migrację i inwazję komórek raka endometrium. Wpływ BMI-1 na potencjał migracyjny komórek raka endometrium może być wynikiem regulacji ekspresji genów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym, takich jak *SNAIL*, *SLUG* i *CDH1*.
5. Zmniejszenie ekspresji BMI-1 i poziomu fosforylacji kinazy AKT jest charakterystyczne dla zaawansowanego stadium nowotworu endometrium.
6. W preparatach prawidłowego endometrium obserwuje się znaczącą odwrotną korelację pomiędzy ekspresją BMI-1 a ekspresją fosfataz PHLPP, szczególnie PHLPP1. W przypadku nowotworów korelacja taka obserwowana jest tylko w preparatach wykazujących ekspresję PTEN, co sugeruje być może konieczne jest współdziałanie obu białek w regulacji fosfataz PHLPP.

Zatem można stwierdzić, że BMI-1 może odgrywać rolę czynnika, który łączy hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem i progresją raka endometrium, a jego działanie zależy od kontekstu molekularnego przede wszystkim ekspresji funkcjonalnej fosfatazy PTEN.

10. Streszczenie

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

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

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

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

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

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

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że BMI-1 może odgrywać rolę czynnika, który łączy hiperglikemię i insulinooporność z rozwojem i progresją raka endometrium poprzez regulację AKT, a jego działanie zależy od kontekstu molekularnego przede wszystkim ekspresji funkcjonalnej fosfatazy PTEN.

11. Summary

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

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

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

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

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

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

12. Bibliografia

1. Akiyama-Abe A, Minaguchi T, Nakamura Y, et al. Loss of PTEN expression is an independent predictor of favourable survival in endometrial carcinomas. *Br J Cancer*. 2013; 109: 1703-1710.
2. Andrabi S, Gjoerup OV, Kean JA, Roberts TM, Schaffhausen B. Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *PNAS*. 2007; 104(48): 19011-19016.
3. Andreozzi F, Procopio C, Greco A, Mannino GC, Miele C, Raciti GA, Iadicicco C, Beguinot F, Pontiroli AE, Hribal ML, et al. Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucinerich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance. *Diabetologia*. 2011; 54(7): 1879–1887.
4. Abd El hafez A, El-Hadaad HA. Immunohistochemical expression and prognostic relevance of Bmi-1, a stem cell factor, in epithelial ovarian cancer. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2014; 18(2): 58-62.
5. Abdouh M, Chato W, El Hajjar J, David J, Ferreira J, Bernier G. Bmi1 is down-regulated in the aging brain and displays antioxidant and protective activities in neurons. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31870.
6. Alster O, Korwek Z. 2014. Znaczniki starzenia komórkowego. *Postępy Biochemii*, 2014; 60(2): 138-146.
7. Alzrigat M, Párraga AA, Majumder MM, Ma A, Jin J, Österborg A, Nahi H, NilssonK, Heckman CA, Öberg F, Kalushkova A, Jernberg-Wiklund H. The polycomb group protein BMI-1 inhibitor PTC-209 is a potent anti-myeloma agent alone or in combination with epigenetic inhibitors targeting EZH2 and the BET bromodomains. *Oncotarget*. 2017; Oct 20; 8(61): 103731-103743.
8. Andrabi S, Gjoerup OV, Kean JA, Roberts TM, Schaffhausen B. Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 27; 104(48): 19011-6. Epub 2007 Nov 15.
9. Athanassiadou P, Athanassiades P, Grapsa D, et al. The prognostic value of PTEN, p53, and beta-catenin in endometrial carcinoma: a prospective immunocytochemical study. *Int J Gynecol Cancer*. 2007; 17:697-704.
10. Ball AJ, Levine F. Telomere-independent cellular senescence in human fetal cardiomyocytes. *Aging Cell*. 2005 Feb; 4(1): 21-30.
11. Bandhavkar S. Cancer stem cells: a metastasizing menace! *Cancer Med*. 2016; 5: 649-655.
12. Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 Aug; 40(8): 1957-67.
13. Bartucci M, Hussein MS, Huselid E, Flaherty K, Patrizii M, Laddha SV, Kui C, Bigos RA, Gilleran JA, El Ansary MMS, Awad MAM, Kimball SD, Augeri DJ, Sabaawy HE. Synthesis and Characterization of Novel BMI1 Inhibitors Targeting Cellular Self-Renewal in Hepatocellular Carcinoma. *Target Oncol*. 2017 Aug; 12(4): 449-462.

14. Behera S, Kapadia B, Kain V, Alamuru-Yellapragada NP, Murunikkara V, Kumar ST, Babu PP, Seshadri S, Shivarudraiah P, Hiriyani J, Gangula NR, Maddika S, Misra P, Parsa KVL. ERK1/2 activated PHLPP1 induces skeletal muscle ER stress through the inhibition of a novel substrate AMPK. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 May; 1864(5 Pt A): 1702-1716.
15. Berstein LM, Kvatchevskaya JO, Poroshina TE, Kovalenko IG, Tsyrlina EV, Zimarina TS, Ourmantcheeva AF, Ashrafian L, Thijssen JH. Insulin resistance, its consequences for the clinical course of the disease, and possibilities of correction in endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004, Nov; 130(11): 687-93.
16. Bhattacharya R, Nicoloso M, Arvizo R, Wang E, Cortez A, Rossi S, Calin GA, Mukherjee P. MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2009 Dec 1; 69(23): 9090-5.
17. Bhattacharya R, Mustafi SB, Street M, Dey A, Dwivedi SK. 2015. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. *Genes & Diseases*, 2(3): 225–239.
18. Biela A, Pacholska-Bogalska J. Nowotwory hormonozależne u kobiet. *Borgis-Nowa Medycyna* 4/2012, s. 76-81.
19. Bielak- Żmijewski A, Grabowska W, Przybylska D. Rola starzenia komórkowego w starzeniu organizmu i chorobach związanych z wiekiem. 2014, *Postępy Biochemii*, 60: 147-160.
20. Blanco-Aparicio C, Renner O, Lean JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway; *Carcinogenesis*. 2007; 28(7): 1379-1386.
21. Bommi PV, Dimri M, Sahasrabuddhe AA, Khandekar J, Dimri GP. The polycomb group protein BMI1 is a transcriptional target of HDAC inhibitors. *Cell Cycle*, 2010; 9: 2663-2673.
22. 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. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov; 68(6): 394-424.
23. Bruchim I, Sarfstein R, Werner H: The IGF Hormonal Network in Endometrial Cancer: Functions, Regulation, and Targeting Approaches. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 19; 5:76.
24. Campisi J. 2013. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75: 685-705.
25. Cannon CE, Titchenell PM, Groff DN, El Ouaamari A, Kulkarni RN, Birnbaum MJ, Stoffers DA. The Polycomb protein, Bmi1, regulates insulin sensitivity. *Mol Metab*. 2014 Aug 27; 3(8): 794-802
26. Cao L, Bombard J, Cintron K, Sheedy J, Weetall ML, Davis TW. BMI1 as a novel target for drug discovery in cancer. *Journal of cellular Biochemistry*, 2011; 112: 2729–41.
27. Caricilli AM, Penteadó E, de Abreu LL, Quaresma PG, Santos AC, Guadagnini D, Razolli D, Mittestainer FC, Carnevali JB, Velloso LA, Saad MJ, Prada PO. Topiramate treatment improves hypothalamic insulin and leptin signaling and action and reduces obesity in mice. *Endocrinology*. 2012 Sep; 153(9): 4401-11.
28. Chang B, Li S, He Q, Liu Z, Zhao L, Zhao T, Wang A. Dereglulation of Bmi-1 is associated with enhanced migration, invasion and poor prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Dec; 1840(12): 3285-91.

29. Chang X, Sun Y, Han S, Zhu W, Zhang H, Lian S. MiR-203 inhibits melanomainvasive and proliferative abilities by targeting the polycomb group gene BMI1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2; 456(1): 361-6.
30. Charo LM, Plaxe SC. Recent advances in endometrial cancer: a review of key clinical trials from 2015 to 2019. *F1000Res.* 2019 Jun 12; 8. pii: F1000 Faculty Rev-849.
31. Chato W, Abdouh M, David J, Champagne MP, Ferreira J, Rodier F, Bernier G. The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J Neurosci.* 2009 Jan 14; 29(2): 529-42.
32. Chen T, Xu C, Chen J, Ding C, Xu Z, Li C, Zhao J. MicroRNA-203 inhibits cellular proliferation and invasion by targeting Bmi1 in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 2015 Jun; 9(6): 2639-2646.
33. Chen F, Chen L, He H, Huang W, Zhang R, Li P, Meng Y, Jiang X. Up-regulation of microRNA-16 in Glioblastoma Inhibits the Function of Endothelial Cells and Tumor Angiogenesis by Targeting Bmi-1. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016; 16(5): 609-20.
34. Chen SM, Wang BY, Lee CH, Lee HT, Li JJ, Hong GC, Hung YC, Chien PJ, Chang CY, Hsu LS, Chang WW. Hinokitiol up-regulates miR-494-3p to suppress BMI1 expression and inhibits self-renewal of breast cancer stem/progenitor cells. *Oncotarget.* 2017 Jun 27; 8(44): 76057-76068.
35. Chen D, Wu M, Li Y, Chang I, Yuan Q, Ekimyan-Salvo M, Deng P, Yu B, Yu Y, Dong J, Szymanski JM, Ramadoss S, Li J, Wang CY. Targeting BMI1(+) Cancer Stem Cells Overcomes Chemoresistance and Inhibits Metastases in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell.* 2017 May 4; 20(5): 621-634.e6.
36. Chen CY, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Jul 9; 9: 338.
37. Chen H, Jin L, Zhou L, Huang JM. Overexpressed miR-128a enhances chemoradiotherapy to laryngeal cancer cells and its correlation with BMI1. *Future Oncol.* 2018 Mar; 14(7): 611-620.
38. Cheng Y, Yang X, Deng X, Zhang X, Li P, Tao J, Lu Q. MicroRNA-218 inhibits bladder cancer cell proliferation, migration, and invasion by targeting BMI-1. *Tumour Biol.* 2015 Sep; 36(10): 8015-23.
39. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and – independent manners in mice. *Hepatology,* 2010; 52: 1111-1123.
40. Cho JH, Dimri M, Dimri GP. MicroRNA-31 is a transcriptional target of histone deacetylase inhibitors and a regulator of cellular senescence. *J Biol Chem.* 2015 Apr 17; 290(16): 10555-67.
41. Choi AR, Kim JH, Yoon S. Sensitization of cancer cells through reduction of total Akt and downregulation of salinomycin-induced pAkt, pGSK3 β , pTSC2, and p4EBP1 by cotreatment with MK-2206 [published correction appears in *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 138260]. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 295760.
42. Chowdhury M, Mihara K, Yasunaga S, Ohtaki M, Takihara Y, Kimura A. Expression of Polycomb-group (PcG) protein BMI-1 predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia,* 2007; 21: 1116-1122.

43. Cordisco S, Maurelli R, Bondanza S, Stefanini M, Zambruno G, Guerra L, Dellambra E. Bmi-1 reduction plays a key role in physiological and premature aging of primary human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2010 Apr; 130(4): 1048-62.
44. Cozzone D, Frojdo S, Disse E, Debard C, Laville M, Pirola L, Vidal H. Isoform-specific defects of insulin stimulation of Akt/protein kinase B (PKB) in skeletal muscle cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2008; 51(3): 512–521.
45. Cui JG, Zhao Y, Sethi P, Li YY, Mahta A, Culicchia F, Lukiw WJ. Micro-RNA-128 (miRNA-128) down-regulation in glioblastoma targets ARP5 (ANGPTL6), Bmi-1 and E2F-3a, key regulators of brain cell proliferation. *J Neurooncol.* 2010 Jul; 98(3): 297-304.
46. Cui J, Cheng Y, Zhang P, Sun M, Gao F, Liu C, Cai J. Down regulation of miR200c promotes radiation-induced thymic lymphoma by targeting BMI1. *J Cell Biochem.* 2014 Jun; 115(6): 1033-42.
47. Dang Z, Xu WH, Lu P, Wu N, Liu J, Ruan B, Zhou L, Song WJ, Dou KF. MicroRNA-135a inhibits cell proliferation by targeting Bmi1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Biol Sci.* 2014 Jun 24; 10(7): 733-45.
48. Datta S, Guo WJ, Band V, Dimri GP. Mel-18, a Polycomb Group Protein, Regulates Cell Proliferation and Senescence via transcriptional repression of BMI-1 and c-Myc oncoproteins. *Molecular Biology of Cell,* 2007; 18(2): 536-546.
49. Deng Y, Xiong Y, Liu Y. miR-376c inhibits cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting BMI1. *Int J Exp Pathol.* 2016 Jun; 97(3): 257-65.
50. 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): 659-70.
51. Dey A, Xiong X, Crim A, Dwivedi SKD, Mustafi SB, Mukherjee P, Cao L, Sydorenko N, Baiazitov R, Moon YC, Dumble M, Davis T, Bhattacharya R. Evaluating the Mechanism and Therapeutic Potential of PTC-028, a Novel Inhibitor of BMI-1 Function in Ovarian Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2018 Jan; 17(1): 39-49.
52. Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2002 Aug 15; 62(16): 4736-45.
53. Dimri M, Carroll JD, Cho JH, Dimri GP. microRNA-141 regulates BMI1 expression and induces senescence in human diploid fibroblasts. *Cell Cycle.* 2013 Nov 15; 12(22): 3537-46.
54. Dong P, Kaneuchi M, Watari H, Hamada J, Sudo S, Ju J, Sakuragi N. MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Mol Cancer.* 2011 Aug 18; 10: 99.
55. Duan Q, Li H, Gao C, Zhao H, Wu S, Wu H, Wang C, Shen Q, Yin T. High glucose promotes pancreatic cancer cells to escape from immune surveillance via AMPK-Bmi1-GATA2-MICA/B pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 May 14; 38(1): 192.
56. Dybko J, Kuliczowski K. Białko BMI-1 I jego rola w procesie samoodnowy i starzenia się komórek macierzystych. *Znaczenie BMI-1 w białaczkach. Acta Haematologica Polonica,* 2010; 41(4): 493-500.

57. Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Du W, Sakamoto M. Bmi-1 gene is upregulated in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 expression. *Cancer Sci.*, 2010; 101: 666-672.
58. El Hajjar J, Chato W, Hanna R, Nkanza P, Tétreault N, Tse YC, Wong TP, Abdouh M, Bernier G. Heterochromatic genome instability and neurodegeneration share similarities with Alzheimer's disease in old Bmi1^{+/-} mice. *Sci Rep.* 2019 Jan 24; 9(1): 594.
59. Engelsens IB, Mannelqvist M, Stefansson IM, Carter SL, Beroukhim R, Øyan AM, Otte AP, Kalland KH, Akslen LA, Salvesen HB. Low BMI-1 expression is associated with an activated BMI-1-driven signature, vascular invasion, and hormone receptor loss in endometrial carcinoma. *Br J Cancer.* 2008 May 20; 98(10): 1662-9.
60. Fasano CA, Dimos JT, Ivanova NB, Lowry N, Lemischka IR, Temple S. shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 87-99.
61. Fassnacht M, Weismann D, Ebert S, Adam P, Zink M, Beuschlein F, Hahner S, Allolio B, AKT is highly phosphorylated in pheochromocytomas but not in benign adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2005; 90(7): 4366-4370.
62. Feng ZZ, Chen JW, Yang ZR, et al. Expression of PTTG1 and PTEN in endometrial carcinoma: correlation with tumorigenesis and progression. *Med Oncol.* 2012; 29: 304-310.
63. Fesler A, Liu H, Ju J. Modified miR-15a has therapeutic potential for improving treatment of advanced stage colorectal cancer through inhibition of BCL2, BMI1, YAP1 and DCLK1. *Oncotarget.* 2017 Dec 19; 9(2): 2367-2383.
64. Flannery CA, Saleh FL, Choe GH, Selen DJ, Kodaman PH, Kliman HJ, Wood TL, Taylor HS. Differential Expression of IR-A, IR-B and IGF-1R in Endometrial Physiology and Distinct Signature in Adenocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(7): 2883-91.
65. Franco S, Raveh-Amit H, Kobolak J, Alqahtani MH, Mobasher A, Dinneys A. The crossroads between cancer stem cells and aging. *BMC Cancer.* 15 (Suppl 1): S1.
66. Fu WM, Tang LP, Zhu X, Lu YF, Zhang YL, Lee WY, Wang H, Yu Y, Liang WC, Ko CH, Xu HX, Kung HF, Zhang JF. MiR-218-targeting-Bmi-1 mediates the suppressive effect of 1,6,7-trihydroxyxanthone on liver cancer cells. *Apoptosis.* 2015; 20: 75-82.
67. Fukuda A, Morris J, Hebrok M. Bmi1 is Required for Regeneration of the Exocrine Pancreas in Mice. *Gastroenterology.* 2012; 143(3): 821-840.
68. Gao Q, Ye F, Xia X, et al. Correlation between PTEN expression and PI3K/Akt signal pathway in endometrial carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2009; 29: 59-63.
69. Gao F, Huang W, Zhang Y, et al. Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/Akt/GSK3 β pathway in human colon cancer. *Oncotarget.* 2015; 6: 38667-38680.
70. Gauza M, Urbanowicz I. Komórki macierzyste i ich zastosowanie w chorobach hematologicznych. *Journal of Laboratory Diagnostics.* 2014; 50(3): 241-248.
71. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2005; 55(3): 178-94.

72. Grenda A, Budzyński M, Filip AA. Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych. *Postępy Hig Med Dosw.* 2013; 67: 174-185.
73. Griffith J, Andrade D, Mehta M, Berry W, Benbrook DM, Aravindan N, Herman TS, Ramesh R, Munshi A. Silencing BMI1 radiosensitizes human breast cancer cells by inducing DNA damage and autophagy. *Oncol Rep.* 2017 Apr; 37(4): 2382-2390.
74. Grinstein E., Mahotka C.: Stem cell divisions controlled by the proto-oncogene BMI-1. *J. Stem Cells*, 2009; 4: 141-146.
75. Grzechnik AT, Newton AC. PHLPPing through history: a decade in the life of PHLPP phosphatases. *Biochem Soc Trans.* 2016; 44: 1675-1682.
76. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* 2008 Nov 15; 68(22): 9125-30.
77. Gong XF, Yu AL, Tang J, Wang CL, He JR, Chen GQ, Zhao Q, He M, Zhou CX. MicroRNA-630 inhibits breast cancer progression by directly targeting BMI1. *Exp Cell Res.* 2018 Jan 15; 362(2): 378-385.
78. Gos M, Miłoszewska J, Przybyszewska M. Rola przejścia epithelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworu. *Postępy Biochemii*, 2009; 55(2): 121-128.
79. Gungorduk K, Ertas IE, Sahbaz A, Ozvural S, Sarica Y, Ozdemir A, Sayhan S, Gokcu M, Yilmaz B, Sanci M, Inan S, Harma M, Yildirim Y. Immunolocalization of ERK1/2 and p-AKT in normal endometrium, endometrial hyperplasia, and early and advanced stage endometrioid endometrial adenocancer and their prognostic significance in malignant group. *European Journey Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 2014; 179: 147-152.
80. Gui T, Bai H, Zeng J, Zhong Z, Cao D, Cui Q, Chen J, Yang J, Shen K: Tumor heterogeneity in the recurrence of epithelial ovarian cancer demonstrated by polycomb group proteins. *Onco. Targets Ther.*, 2014; 7: 1705-1716.
81. Guo WJ, Zeng MS, Yadaw A, Song LB, Guo BH, Band V, Dimri GP. Mel-18 acts as a tumor suppressor by repressing BMI-1 expression and downregulation AKT activity in breast cancer cells. *Cancer Research*, 2007; 67(11): 5083-9.
82. Guo BH, Feng Y, Zhang R, Xu LH, Li MZ, Kung HF, Song LB, Zeng MS. Bmi-1 promotes invasion and metastasis, and its elevated expression is correlated with an advanced stage of breast cancer. *Molecular Cancer*, 2011; 10(1): 1-23.
83. Guo J, Li W, Shi H, Xie X, Li L, Tang H, Wu M, Kong Y, Yang L, Gao J, Liu P, Wei W, Xie X. Synergistic effects of curcumin with emodin against the proliferation and invasion of breast cancer cells through upregulation of miR-34a. *Mol Cell Biochem.* 2013 Oct; 382(1-2): 103-11.
84. Guo S, Xu X, Tang Y, Zhang C, Li J, Ouyang Y, Ju J, Bie P, Wang H. miR-15a inhibits cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma by down-regulating Bmi-1 expression. *Cancer Lett.* 2014 Mar 1; 344(1): 40-46.
85. Hauser B, Zhao Y, Pang X, Ling Z, Myers E, Wang P, Califano J, Gu X. Functions of MiRNA-128 on the regulation of head and neck squamous cell carcinoma growth and apoptosis. *PLoS One.* 2015 Mar 12; 10(3): e0116321.

86. Haupt Y, Bath ML, Harris AW, Adams JM. bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis. *Oncogene*, 1993; 8: 3161-3164.
87. Häyry V, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 892-897.
88. He X, Dong Y, Wu CW, Zhao Z, Ng SS, Chan FK, Sung JJ, Yu J. MicroRNA-218 inhibits cell cycle progression and promotes apoptosis in colon cancer by downregulating BMI1 polycomb ring finger oncogene. *Mol Med*. 2013 Feb 8; 18: 1491-8.
89. He Z, Xia Y, Pan C, Ma T, Liu B, Wang J, Chen L, Chen Y. Up-Regulation of MiR-452 Inhibits Metastasis of Non-Small Cell Lung Cancer by Regulating BMI1. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 37(1): 387-98.
90. Huang R, Cheung N-KV, Vider J, Cheung JY, Gerald WL, Tickoo SK, Holland EC, Blasberg RG. MYCN and MYC regulate tumor proliferation and tumorigenesis directly through BMI-1 in human neuroblastomas. 2011. *The FASEB Journal*, 25(12): 4138-4149.
91. Huang SX, Zhao ZY, Weng GH, He XY, Wu CJ, Fu CY, Sui ZY, Ma YS, Liu T. Upregulation of miR-181a suppresses the formation of glioblastoma stem cells by targeting the Notch2 oncogene and correlates with good prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 May 13; 486(4): 1129-1136.
92. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, et al. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res*. 2004; 64: 3171-3178.
93. Hoenerhoff MJ, Chu I, Barkan D, Liu ZY, Datta S, Dimri GP, Green JE. BMI1 cooperates with H-RAS to induce an aggressive breast cancer phenotype with brain metastases. *Oncogene*, 2009; 28: 3022-3032.
94. Honig A, Weidler C, Häusler S, et al. Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. *Anticancer Res*. 2010; 30: 1559-2164.
95. Houh YK, Kim KE, Park S, Hur DY, Kim S, Kim D, Bang SI, Yang Y, Park HJ, Cho D. The effect of artemisinin on the cytolytic activity of natural killer (NK) cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. 18(7): 1600.
96. Hsu CC, Chang WC, Hsu TI, Liu JJ, Yeh SH, Wang JY, Liou JP, Ko CY, Chang KY, Chuang JY. Suberoylanilide hydroxamic acid represses glioma stem-like cells. *J Biomed Sci*. 2016 Nov 18; 23(1): 81.
97. Inaba F, Kawamata H, Teramoto T, et al. PTEN and p53 abnormalities are indicative and predictive factors for endometrial carcinoma. *Oncol Rep*. 2005; 13:17-24.
98. Ismail IH, Gagné JP, Caron MC, McDonald D, Xu Z, Masson JY, Poirier GG, Hendzel MJ. 2012. CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 2012; 40(12): 5497–5510.
99. Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, Jacobs JJ, Van Lohuizen M, Band V, Campisi J, Dimri GP. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan; 23(1): 389-401.

100. Jagani Z, Wiederschain D, Loo A, He D, Mosher R, Fordjour P, Monahan J, Morrissey M, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. The Polycomb group protein Bmi-1 is essential for the growth of multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2010 Jul 1; 70(13): 5528-38.
101. Javle MM, Shroff RT, Xiong H, Varadhachary GA, Fogelman D, Reddy SA, Davis D, Zhang Y, Wolff RA, Abbruzzese JL. Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in advanced pancreatic cancer: results of two phase II studies. *BMC cancer*, 2010; 10(368): 1-7.
102. Jiang L, Li J, Song L. Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2009. 41: 527–534.
103. Jiang L, Wu J, Yang Y, Liu L, Song L, Li J, Li M. Bmi-1 promotes the aggressiveness of glioma via activating the NF-kappaB/MMP-9 signaling pathway. *BMC Cancer*, 2012; 12: 406.
104. Jiang L, Song L, Wu J, Yang Y, Zhu X, Hu B, Cheng SY, Li M. Bmi-1 promotes glioma angiogenesis by activating NF-κB signaling. *PLoS One*, 2013; 8: e55527.
105. Jiao K, Jiang W, Zhao C, Su D, Zhang H. Bmi-1 in gallbladder carcinoma: Clinicopathology and mechanism of regulation of human gallbladder carcinoma proliferation. *Oncol Lett.* 2019 Aug; 18(2): 1365-1371.
106. Jiao M, Qi M, Zhang F, Hu J, Feng T, Zhao M, Li X, Liu H, Teng W, Zhang J, Liu Z, Zhang L, Wu Z, Han B. CUL4B regulates cancer stem-like traits of prostate cancer cells by targeting BMI1 via miR200b/c. *Prostate.* 2019 Aug; 79(11):1294-1303.
107. Jin M, Zhang T, Liu C, Badeaux MA, Liu B, Liu R, Jeter C, Chen X, Vlassov AV, Tang DG. miRNA-128 suppresses prostate cancer by inhibiting BMI-1 to inhibit tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 2014 Aug 1; 74(15): 4183-95.
108. Jin J, Tao J, Gu X, Yu Z, Wang R, Zuo G, Li Q, Lv X, Miao D. P16 (INK4a) Deletion Ameliorated Renal Tubulointerstitial Injury in a Stress-induced Premature Senescence Model of Bmi-1 Deficiency. *Sci Rep.* 2017 Aug 8; 7(1):7502.
109. Joensuu K, Hagström J, Leidenius M, Haglund C, Andersson LC, Sariola H, Heikkilä P. BMI-1, c-Myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases elevated BMI-1 expression in late breast cancer relapses. *Virchows Archiv*, 2011; 459(1):31-9.
110. Jung JW, Lee S, Seo MS, Park SB, Kurtz A, Kang SK, Kang KS. Histone deacetylase controls adult stem cell aging by balancing the expression of polycomb genes and jumonji domain containing 3. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010; 67: 1165-1176.
111. Kanan Y, Matsumoto H, Song H, Sokolov M, Anderson RE, Rajala RV. Serine/Threonine Kinase AKT Activation Regulates the Activity of Retinal Serine/Threonine Phosphatases, PHLPP and PHLPP1. *Journal of Neurochemistry*, 2010; 113(2): 477-488.
112. Kim DJ, Jun YH, Kim DH, Kim JJ. Effect of BMI1 Knockdown on Cell Proliferation, Apoptosis, Invasiveness, and Migration of U251 Glioma Cells. *Korean J Phys Anthropol.* 2015, Vol. 28, No. 2, pp.69~78.
113. Kim BR, Kwon Y, Rho SB. BMI-1 interacts with sMEK1 and inactivates sMEK1-induced apoptotic cell death. *Oncol Rep.* 2017 Jan; 37(1): 579-586.

114. Kim JS, Choi DW, Kim CS, Yu SK, Kim HJ, Go DS, Lee SA, Moon SM, Kim SG, Chun HS, Kim J, Kim JK, Kim DK. MicroRNA-203 Induces Apoptosis by Targeting Bmi-1 in YD-38 Oral Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2018 Jun; 38(6): 3477-3485.
115. Kim M, Lee S, Park WH, Suh DH, Kim K, Kim YB, No JH. Silencing Bmi1 expression suppresses cancer stemness and enhances chemosensitivity in endometrial cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec; 108: 584-589.
116. Klemba A, Kukwa W, Bartnik E, Krawczyk T, Scińska A, Golik P, Czarnecka AM. [Molecular biology of endometrial carcinoma]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008, Aug 18; 62: 420-32.
117. Konstat-Korzenny E, Ascencio-Aragon JA, Niezen-Lugo S, Vazquez-Lopez R. 2018. Artemisinin and its synthetic Derivatives as a possible therapy for cancer. *Medical Sciences*, 2018; 6(1): 19.
118. Kopp F, Oak PS, Wagner E, Roidl A. miR-200c sensitizes breast cancer cells to doxorubicin treatment by decreasing TrkB and Bmi1 expression. *PLoS One.* 2012; 7(11): e50469.
119. Kozak J, Wdowiak P, Maciejewski R, Torres A. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology.* 2018; 70(1): 339-350.
120. Krawczyk B, Rychlewski P, Fabianowska-Majewska K. PTEN-białko supresorowe: regulacja białka i ekspresji genu, *Postępy Biologii Komórki.* 2006; 33: 365-380.
121. Kreso A, van Galen P, Pedley NM, Lima-Fernandes E, Frelin C, Davis T, Cao L, Baiazitov R, Du W, Sydorenko N, Moon YC, Gibson L, Wang Y, Leung C, Iscove NN, Arrowsmith CH, Szentgyorgyi E, Gallinger S, Dick JE, O'Brien CA. 2014. Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nature Medicine*, 20(1): 29-36.
122. Krześlak A. [Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2010 Oct 19; 64: 490-503.
123. Kuo SZ, Blair KJ, Rahimy E, Kiang A, Abhold E, Fan JB, Wang-Rodriguez J, Altuna X, Ongkeko WM. Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and AKT. *BMC Cancer*, 2012; 12: 556.
124. Kurihara K, Isobe T, Yamamoto G, Tanaka Y, Katakura A, Tachikawa T. Expression of BMI1 and ZEB1 in epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2015 Aug; 34(2): 771-8.
125. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680-685.
126. Lai GH, Huang AL, Zhao Z, Lu XH, Zu WX. [MicroRNA-218 promotes osteosarcoma cell apoptosis by down-regulating oncogene B lymphoma mouse Moloney leukemia virus insertion region 1]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2018 May 20; 38(5): 505-510.
127. Lai Y, Sun C. Association of abnormal glucose metabolism and insulin resistance in patients with atypical and typical endometrial cancer. *Oncol Lett.* 2018; 15(2): 2173-2178.

128. Lessard J., Sauvageau G.: Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 2003; 423: 255-260.
129. Li SK, Smith DK, Leung WY, Cheung AM, Lam EW, Dimri GP, Yao KM. FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 16545-16553.
130. Li J, Gong LY, Song LB, Jiang LL, Liu LP, Wu J, Yuan J, Cai JC, He M, Wang L, Zeng M, Cheng SY, Li M. Oncoprotein Bmi-1 renders apoptotic resistance to glioma cells through activation of the IKK-nuclear factor-kappaB Pathway. *Am J Pathol.* 2010 Feb; 176(2): 699-709.
131. Li X, Yang Z, Song W, et al. Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol.* 2013; 43: 793-802.
132. Li C, Tu K, Zheng X, Zhang J, Tuo H, Gao J, Yao Y, Liu Q. [MicroRNA-218 expression and its role in hepatocellular carcinoma]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2013 Aug; 33(8): 1127-31.
133. Li Z, Wang Y, Yuan C, Zhu Y, Qiu J, Zhang W, Qi B, Wu H, YeJ, Jiang H, Yang J, Cheng J. Oncogenic roles of Bmi1 and its therapeutic inhibition by histone deacetylase inhibitor in tongue cancer. *Lab. Invest.*, 2014; 94: 1431-1445.
134. Li B, Chen H, Wu N, Zhang WJ, Shang LX. Deregulation of miR-128 in ovarian cancer promotes cisplatin resistance. *Int J Gynecol Cancer.* 2014 Oct; 24(8): 1381-8.
135. Li H, Song F, Chen X, Li Y, Fan J, Wu X. Bmi-1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition to promote migration and invasion of breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 May 15; 7(6): 3057-64.
136. Li X, Shao R. PCOS and obesity: insulin resistance might be a common etiology for the development of type I endometrial carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2014 Jan15; 4(1): 73-9.
137. Li F, Liang A, Lv Y, Liu G, Jiang A, Liu P. MicroRNA-200c Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition by Targeting the BMI-1 Gene Through the Phospho-AKT Pathway in Endometrial Carcinoma Cells In Vitro. *Med Sci Monit.* 2017 Oct 28; 23: 5139-5149.
138. Li X, Song Y, Liu D, Zhao J, Xu J, Ren J, Hu Y, Wang Z, Hou Y, Zhao G. MiR-495 Promotes Senescence of Mesenchymal Stem Cells by Targeting Bmi-1. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 42(2): 780-796.
139. Li A, Qiu M, Zhou H, Wang T, Guo W. PTEN, Insulin Resistance and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(25): 3667-3676.
140. Li W, Zhang X, Sang H, Zhou Y, Shang C, Wang Y, Zhu H. Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jul 23; 38(1): 327.
141. Lin X, Tirichine L, Bowler C. Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. *Plant Methods.* 2012 Dec 7; 8(1): 48.
142. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.*, 2006; 66: 6063-6071.

143. Liu J, Stevens PD, Gao T. mTOR-dependent regulation of PHLPP expression controls the rapamycin sensitivity in cancer cells. *J Biol Chem.* 2011; 286(8): 6510-6520.
144. Liu J, Stevens PD, Gao T. mTOR-dependent regulation of PHLPP expression controls the rapamycin sensitivity in cancer cells. *J Biol Chem.* 2011 Feb 25; 286(8): 6510-20.
145. Liu ZG, Liu L, Xu LH, Yi W, Tao YL, Tu ZW, Li MZ, Zeng MS, Xia YF. Bmi-1 induces radioresistance in MCF-7 mammary carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012 Apr; 27(4): 1116-22.
146. Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, Xu X. miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1. *Am J Pathol.* 2012 Nov; 181(5): 1823-35.
147. Liu Y, Liu F, Yu H, Zhao X, Sashida G, Deblasio A, Harr M, She QB, Chen Z, Lin HK, Di Giandomenico S, Elf SE, Yang Y, Miyata Y, Huang G, Menendez S, Mellinghoff IK, Rosen N, Pandolfi PP, Hedvat CV, Nimer SD. Akt phosphorylates the transcriptional repressor Bmi1 to block its effects on the tumor-suppressing Ink4a-Arf locus. *Science Signaling,* 2013; 5(247): 1-23.
148. Liu L, Chen K, Wu J, Shi L, Hu B, Cheng S, Li M, Song L. Downregulation of miR-452 promotes stem-like traits and tumorigenicity of gliomas. *Clin Cancer Res.* 2013 Jul 1; 19(13): 3429-38.
149. Liu L, Qiu M, Tan G, Liang Z, Qin Y, Chen L, Chen H, Liu J. miR-200c inhibits invasion, migration and proliferation of bladder cancer cells through down-regulation of BMI-1 and E2F3. *J Transl Med.* 2014 Nov 4; 12: 305.
150. Liu Y, Chu Z, Li Q, Peng B, Xu S, Lian CG, Geng S. Downregulation of Bmi-1 suppresses epithelial-mesenchymal transition in melanoma. *Oncol Rep.* 2017 Jan; 37(1): 139-146.
151. Liu P, Zhang M, Niu Q, Zhang F, Yang Y, Jiang X. Knockdown of long non-coding RNA ANRIL inhibits tumorigenesis in human gastric cancer cells via microRNA-99a-mediated down-regulation of BMI1. *Braz J Med Biol Res.* 2018 Aug 16; 51(10): e6839.
152. Lo WL, Yu CC, Chiou GY, Chen YW, Huang PI, Chien CS, Tseng LM, Chu PY, Lu KH, Chang KW, Kao SY, Chiou SH. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J Pathol.* 2011 Mar; 223(4): 482-95.
153. Lopez R, Arumugam A, Joseph R, Monga K, Boopalan T, Agullo P, Gutierrez C, Nandy S, Subramani R, de la Rosa JM, Lakshmanaswamy R. Hyperglycemia enhances the proliferation of non-tumorigenic and malignant mammary epithelial cells through increased leptin/IGF1R signaling and activation of AKT/mTOR. *PLoS One.* 2013 Nov 18; 8(11): e79708.
154. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry,* 1951; 193(1): 265-75.
155. Lukacs RU, Memarzadeh S, Wu H, Witte O.N. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation. *Cell Stem Cell,* 2010; 7: 682-693.

156. Luo H, Yang R, Li C, Tong Y, Fan L, Liu X, Xu C. MicroRNA-139-5p inhibits bladder cancer proliferation and self-renewal by targeting the Bmi1 oncogene. *Tumour Biol.* 2017 Jul; 39(7): 1010428317718414.
157. Ma J, Lanza DG, Guest I, Uk-Lim C, Glinskii A, Glinsky G, Sell S. Characterization of mammary cancer stem cells in the MMTV-PyMT mouse model. *Tumour Biol.*, 2012; 33: 1983-1996.
158. Madathan Kandy S, Ishwara Bhat D, Choppavarapu L, Suvatha A, Ghati Kasturirangan C. Overexpression and lack of copy number variation in the BMI-1 gene in human glioma. *Oncol. Lett.*, 2015; 10: 3318-3322.
159. Maeda A, Nishida Y, Weetall M, Cao L, Branstrom A, Ishizawa J, Nii T, Schober WD, Abe Y, Matsue K, Yoshimura M, Kimura S, Kojima K. Targeting of BMI-1 expression by the novel small molecule PTC596 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget.* 2018 Jun 19; 9(47): 28547-28560.
160. Majorek K, Krzyżosiak WJ. Role of microRNA in pathogenesis, diagnostics and therapy of cancer. *Wspólcz Onkol* 2006 vol. 10; 8 (359–366).
161. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017 Apr 20; 169(3): 381-405.
162. Markowska A, Pawałowska M, Lubin J, Markowska J. Signalling pathways in endometrial cancer. *Contemp Oncol (Pozn).* 2014; 183: 143- 148.
163. Mas-Bargues C, Viña-Almunia J, Inglés M, Sanz-Ros J, Gambini J, Ibáñez-Cabellos JS, García-Giménez JL, Viña J, Borrás C. Role of p16(INK4a) and BMI-1 in oxidative stress-induced premature senescence in human dental pulp stem cells. *Redox Biol.* 2017 Aug; 12: 690-698.
164. Mathur A, Pandey VK, Kakkar P. PHLPP: a putative cellular target Turing insulinresistance and type 2 diabetes. *J Endocrinol.* 2017; 233(3): R185-R198.
165. Mayr, C, Wagner, A, Loeffelberger M, Bruckner D, Jakab M, Berr, F. et al. The BMI1 inhibitor PTC-209 is a potential compound to halt cellular growth in biliary tract cancer cells. 2016, *Oncotarget* 7, 745–758.
166. Molofsky A.V., He S., Bydon M., Morrison S.J., Pardal R.: Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.*, 2005; 19: 1432-1437.
167. Molina JR, Agarwal NK, Morales FC, et al. PTEN, NHERF1 and PHLPP form a tumor suppressor network that is disabled in glioblastoma. *Oncogene.* 2012; 31(10): 1264-1274.
168. Nacerddine K, Beaudry JB, Ginja V, Westerman B, Mattioli F, Song JY, van der Poel H, Ponz OB, Pritchard C, Cornelissen- Steijger P, Zevenhoven J, Tanger E, Sixma TK, Ganesan S, van Lohuizen M. Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *J. Clin. Invest.*, 2012; 122: 1920-1932.
169. Nanta R, Kumar D, Meeker D, Rodova M, Van Veldhuizen PJ, Shankar S, Srivastava RK. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2R γ null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. *Oncogenesis*, 2013; 2: e42.
170. Newton AC, Trotman LC. Turning off AKT: PHLPP as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014; 54: 537-58.

171. Ni J, Zhu T, Zhao L, Che F, Chen Y, Shou H, Yu A. Metabolic syndrome is an independent prognostic factor for endometrial adenocarcinoma. *Clin Transl Oncol.*, 2015; 17(10): 835-9.
172. Nishida Y, Maeda A, Kim MJ, Cao L, Kubota Y, Ishizawa J, AlRawi A, Kato Y, Iwama A, Fujisawa M, Matsue K, Weetall M, Dumble M, Andreeff M, Davis TW, Branstrom A, Kimura S, Kojima K. The novel BMI-1 inhibitor PTC596 downregulates MCL-1 and induces p53-independent mitochondrial apoptosis in acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood Cancer J.* 2017 Feb 17; 7(2): e527.
173. Nowak K, Kerl K, Fehr D, Kramps C, Gessner C, Killmer K, Samans B, Berwanger B, Christiansen H, Lutz W. BMI-1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Research*, 2006; 34(6): 1745-1754.
174. Olejek A, Olszak-Wasik K, Horzelski T, Nowak L, Zamłyński J, Lange D. Rak błony śluzowej macicy u 25-letniej pacjentki. Opis przypadku [Endometrial cancer in a 25-year-old patient. Case study]. *Ginekol Pol.* 2012; 83(3): 224-228.
175. Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells and senescence regulation. *Journal of Clinical Investigation*, 2004, 113(2): 175-179.
176. Patel N, Garikapati KR, Ramaiah MJ, Polavarapu KK, Bhadra U, Bhadra MP. miR-15a/miR-16 induces mitochondrial dependent apoptosis in breast cancer cells by suppressing oncogene BMI1. *Life Sci.* 2016 Nov 1; a164:60-70.
177. Patel N, Garikapati KR, Makani VKK, Nair AD, Vangara N, Bhadra U, Pal Bhadra M. Regulating BMI1 expression via miRNAs promote Mesenchymal to Epithelial Transition (MET) and sensitizes breast cancer cell to chemotherapeutic drug. *PLoS One.* 2018 Feb 2; 13(2): e0190245.
178. Pavlidou A, Vlahos NF. Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: a therapeutic target in endometrial cancer. *Scientific World Journal.* 2014 Jan 12; 2014: 709736.
179. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016 Jan 28; 1: 15004.
180. Peng G, Liao Y, Shen C. miRNA-429 Inhibits Astrocytoma Proliferation and Invasion by Targeting BMI1. *Pathol Oncol Res.* 2017 Apr; 23(2): 369-376.
181. Pergoł P, Nowak-Stępniewska A, Drela K, Padzik-Graczyk A. Znaczenie komórek macierzystych w inicjacji i rozwoju nowotworów. *Postępy Biochemii*, 2013; 59(1): 45-52.
182. Polewska J. Autofagia-mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 2012, Vol.66, p921-936.
183. Qi X, Li J, Zhou C, Lv C, Tian M. MicroRNA-320a inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting BMI-1 in nasopharyngeal carcinoma. *FEBS Lett.* 2014 Oct 16; 588 (20): 3732-8.
184. Qin L, Zhang X, Zhang L, Feng Y, Weng GX, Li MZ, Kong QL, Qian CN, ZengYX, Zeng MS, Liao DF, Song LB. 2008. Downregulation of BMI-1 enhances 5-fluorouracil – induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008; 371(3): 531-535.
185. Qin ZK, Yang JA, Ye YI, Zhang X, Xu LH, Zhou FJ, Han H, Liu ZW, Song LB, Zeng MS. Expression of BMI-1 is a prognostic marker in bladder cancer, *BMC Cancer*, 2009. 9: 61.

186. Qiu M, Liang Z, Chen L, Tan G, Wang K, Liu L, Liu J, Chen H. MicroRNA-429 suppresses cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis by direct targeting of BMI1 and E2F3 in renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2015 Jul; 33(7): 332. e9-18.
187. Qiu GZ, Mao XY, Ma Y, Gao XC, Wang Z, Jin MZ, Sun W, Zou YX, Lin J, Fu HL, Jin WL. Ubiquitin-specific protease 22 acts as an oncoprotein to maintain glioma malignancy through deubiquitinating B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 for stabilization. *Cancer Sci.* 2018 Jul; 109(7): 2199-2210.
188. Raaphorst FM. Deregulated expression of Polycomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epithelial tumors. *Hum. Mol. Genet.*, 2005; 14 (Suppl.): R93-R100.
189. Ramteke P, Deb A, Shepal V, Bhat MK. Hyperglycemia Associated Metabolic and Molecular Alterations in Cancer Risk, Progression, Treatment, and Mortality. *Cancers (Basel).* 2019 Sep 19; 11(9).
190. Riggio M, Perrone MC, Polo ML, et al. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep.* 2017; 7: 44244. Published 2017 Mar 13.
191. Rosen ED, Kaestner KH, Natarajan R, Patti ME, Sallari R, Sander M, Susztak K. Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. *Diabetes.* 2018 Oct; 67(10): 1923-1931.
192. Rostoker R, Abelson S, Bitton-Worms K, Genkin I, Ben-Shmuel S, Dakwar M, Orr ZS, Caspi A, Tzukerman M, LeRoith D. Highly specific role of the insulin receptor in breast cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2015; 22(2):145-57.
193. Sahasrabudde AA, Dimri M, Bommi PV, Dimri GP. β TrCP regulates BMI1 protein turnover via ubiquitination and degradation. *Cell Cycle*, 2011; 10: 1322-1330.
194. Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, et al. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *Int J Oncol.* 2004; 25: 1615-1623.
195. Saudy NS, Fawzy IM, Azmy E, Goda EF, Eneen A, Abdul Salam EM. BMI1 gene expression in myeloid leukemias and its impact on prognosis. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2014; 53: 194-198.
196. Sawai H, Yasuda A, Ochi N, Ma J, Matsuo Y, Wakasugi T, Takahashi H, Funahashi H, Sato M, Takeyama H. Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival. *BMC Gastroenterol.* 2008 Nov 26; 8:56.
197. Shahi MH, Farheen S, Mariyath MP, Castresana JS. Potential role of Shh-Gli1-BMI1 signaling pathway nexus in glioma chemoresistance. *Tumour Biol.* 2016 Nov; 37(11): 15107-15114.
198. Shan ZN, Tian R, Zhang M, Gui ZH, Wu J, Ding M, Zhou XF, He J. miR128-1 inhibits the growth of glioblastoma multiforme and glioma stem-like cells via targeting BMI1 and E2F3. *Oncotarget.* 2016 Nov 29; 7(48): 78813-78826.
199. Shao Y, Geng Y, Gu W, Ning Z, Jiang J, Pei H.: Prognostic role of high Bmi-1 expression in Asian and Caucasian patients with solid tumors: a meta-analysis. *Biomed Pharmacother.* 2014 Oct; 68(8): 969-77.

200. Siddique HR, Saleem M. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells*. 2012 Mar; 30(3): 372-8.
201. Smith U, Gale EA.: Does diabetes therapy influence the risk of cancer? *Diabetologia*. 2009; 52(9): 1699-708.
202. Sobczuk A, Wrona M, Sobotkowski J, Szymczak W, Pertyński T. Obesity, diabetes mellitus, arterial hypertension and the risk of endometrial cancer. *Menopause Review/PrzeglądMenopauzalny*. 2007; 6(5): 289-297.
203. Song LB, Li J, Liao WT, Feng Y, Yu CP, Hu LJ, Kong QL, Xu LH, Zhang X, Liu WL, Li MZ, Zhang L, Kang TB, Fu LW, Huang WL, Xia YF, Tsao SW, Li M, Band V, Band H, Shi QH, Zeng YX, Zeng MS. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest*. 2009 Dec; 119(12): 3626-36.
204. Song W, Tao K, Li H, Jin C, Song Z, Li J, Shi H, Li X, Dang Z, Dou K. Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci.*, 2010; 101: 1754-1760.
205. Spsych M, Gottwald L, Jesien-Lewandowicz E, Chałubińska J, Sobotkowski J, Fijuth J. Causes of treatment failure in patients with endometrial cancer treated with postoperative radiotherapy. *Przegląd Menopauzalny*. 2010; 1:32-37.
206. Srinivasan M, Bharali DJ, Sudha T, Khedr M, Guest I, Sell S, Glinsky GV, MousaSA. Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation. *Oncotarget*. 2017 Jun 13; 8(24): 38731-38742.
207. Sugihara H, Ishimoto T, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Komohara Y, Takeya M, Baba H. Identification of miR-30e* regulation of Bmi1 expression mediated by tumor-associated macrophages in gastrointestinal cancer. *PLoS One*. 2013 Nov 28; 8(11): e81839.
208. Sulaiman S, Arafat K, Iratni R, Attoub S. PTC-209 Anti-Cancer Effects Involved the Inhibition of STAT3 Phosphorylation. *Front Pharmacol*. 2019; 10:1199. Published 2019 Oct 21.
209. Sun L, Yao Y, Liu B, Lin Z, Lin L, Yang M, Zhang W, Chen W, Pan C, Liu Q, Song E, Li J. MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1. *Oncogene*. 2012 Jan 26; 31(4): 432-45.
210. Sun W, Lu J, Wu S, Bi Y, Mu Y, Zhao J, Liu C, Chen L, Shi L, Li Q, Yang T, Yan L, Wan Q, Liu Y, Wang G, Luo Z, Tang X, Chen G, Huo Y, Gao Z, Su Q, Ye Z, Wang Y, Qin G, Deng H, Yu X, Shen F, Chen L, Zhao L, Wang T, Sun J, Xu M, Xu Y, Chen Y, Dai M, Zhang J, Zhang D, Lai S, Li D, Ning G, Wang W. Association of insulin resistance with breast, ovarian, endometrial and cervical cancers in non-diabetic women. *Am J.Cancer Res.*, 2016; 6(10): 2334-2344.
211. Symonds CE, Golderisi U, Giordano A. 2009. Aging of the inceptive cellular population: the relationship between stem cells and aging. *Aging*, 2009; 1(4): 372-381.
212. Szaryńska M, Kmiec Z. Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. *Forum Medycyny Rodzinnej*, 2011. 5(1): 47-56.

213. Tanaka Y, Terai Y, Kawaguchi H, Fujiwara S, Yoo S, Tsunetoh S, Takai M, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. Prognostic impact of EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression in endometrial cancer. *Cancer Biol Ther.* 2013 Jan; 14(1): 13-9.
214. Tao MH, Freudenheim JL. DNA methylation in endometrial cancer. *Epigenetics.* 2010 Aug 16; 5(6): 491-8.
215. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Oshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H. Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. *Oncogene.* 2014 Apr 24; 33(17): 2191-203.
216. Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S, (2003) Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 10(2): 203-208.
217. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006; 66: 3963-3966.
218. Tong D, Zhao L, He K, Sun H, Cai D, Ni L, Sun R, Chang S, Song T, Huang C. MECP2 promotes the growth of gastric cancer cells by suppressing miR-338-mediated antiproliferative effect. *Oncotarget.* 2016 Jun 7; 7(23): 34845-59.
219. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (1979), 76(9): 4350-4354.
220. Tu Y, Gao X, Li G, Fu H, Cui D, Liu H, Jin W, Zhang Y. MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1. *Cancer Res.* 2013 Oct 1; 73(19): 6046-55.
221. Tu K, Li C, Zheng X, Yang W, Yao Y, Liu Q. Prognostic significance of miR-218 in human hepatocellular carcinoma and its role in cell growth. *Oncol Rep.* 2014 Oct; 32(4): 1571-7.
222. van Leenders GJ, Dukers D, Hessels D, van den Kieboom SW, Hulsbergen CA, Witjes JA, Otte AP, Meijer CJ, Raaphorst FM. Polycomb-group oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 are overexpressed in prostate cancer with adverse pathologic and clinical features. *Eur. Urol.*, 2007; 52: 455-463.
223. Venkataraman S, Alimova I, Fan R, Harris P, Foreman N, Vibhakar R. MicroRNA 128a increases intracellular ROS level by targeting Bmi-1 and inhibits medulloblastoma cancer cell growth by promoting senescence. *PLoS One.* 2010 Jun 21; 5(6): e10748.
224. Villeneuve LM, Reddy MA, Natarajan R. Epigenetics: deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011 Jul; 38(7): 451-9.
225. Voncken JW, Niessen H, Neufeld B, Rennefahrt U, Dahlmans V, Kubben N, Holzer B, Ludwig S, Rapp UR. MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 5178-5187.
226. Vora P, Seyfrid M, Venugopal C, Qazi MA, Salim S, Isserlin R, Subapanditha M, O'Farrell E, Mahendram S, Singh M, Bakhshinyan D, Chokshi C, McFarlane N,

- Dvorkin-Gheva A, Brown KR, Murty N, Moffat J, Bader GD, Singh SK. Bmi1 regulates human glioblastoma stem cells through activation of differential gene networks in CD133+ brain tumor initiating cells. *J Neurooncol*. 2019 Jul; 143(3): 417-428.
227. Wan X, Li J, Xu X, Lu W. PTEN augments doxorubicin – induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2007; 17(4): 808-12.
228. Wang HB, Liu GH, Zhang H, Xing S, Hu LJ, Zhao WF, Xie B, Li MZ, Zeng BH, Li Y, Zeng MS. Sp1 and c-Myc regulate transcription of BMI1 in nasopharyngeal carcinoma. 2003. *FEBS Journal*, 280: 2929–2944.
229. Wang E, Bhattacharyya S, Szabolcs A, Rodriguez-Aguayo C, Jennings NB, Lopez-Berestein G, Mukherjee P, Sood AK, Bhattacharya R. Enhancing chemotherapy response with Bmi-1 silencing in ovarian cancer. *PLoS One*. 2011 Mar 21; 6(3): e17918.
230. Wang MC, Li CL, Cui J, Jiao M, Wu T, Jing LI, Nan KJ. BMI-1, a promising therapeutic target for human cancer. *Oncology Letters*, 2015, 10: 583-588.
231. Wang T, Chen T, Niu H, Li C, Xu C, Li Y, Huang R, Zhao J, Wu S. MicroRNA-218 inhibits the proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells by targeting BMI1. *Int J Mol Med*. 2015 Jul; 36(1): 93-102.
232. Wang L, Liu JL, Yu L, Liu XX, Wu HM, Lei FY, Wu S, Wang X. Downregulated miR-495 [Corrected] Inhibits the G1-S Phase Transition by Targeting Bmi-1 in Breast Cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2015 May; 94(21): e718.
233. Wang X, Huang H, Young KH. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging*, 2015; 7(12): 1032-1049.
234. Wang X, Wang C, Zhang X, Hua R, Gan L, Huang M, Zhao L, Ni S, Guo W. Bmi-1 regulates stem cell-like properties of gastric cancer cells via modulating miRNAs. *J Hematol Oncol*. 2016 Sep 20; 9(1): 90.
235. Wang MC, Jiao M, Wu T, et al. Polycomb complex protein BMI-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer stem cells by activating PI3K/AKT signaling, an ex vivo, in vitro, and in vivo study. *Oncotarget*. 2016; 7: 9586-9599.
236. Wang Q, Li Z, Wu Y, Huang R, Zhu Y, Zhang W, Wang Y, Cheng J. Pharmacological inhibition of Bmi1 by PTC-209 impaired tumor growth in head neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int*. 2017 Nov 21; 17: 107.
237. Wang X, Wu K, Xiao LK, Wu XY. ShRNA-mediated BMI-1 gene silencing inhibits gastrointestinal stromal tumor cell telomerase activity and enhances apoptosis. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018 Nov; 34(11): 606-615.
238. Wang J, Ji H, Zhu Q, Yu X, Du J, Jiang Z. Co-inhibition of BMI1 and Mel18 enhances chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncol Lett*. 2019 Jun; 17(6): 5012-5022.
239. Wang H, Gu R, Tian F, Liu Y, Fan W, Xue G, Cai L, Xing Y. PHLPP2 as a novel metastatic and prognostic biomarker in non-small cell lung cancer patients. *Thorac Cancer*. 2019 Nov; 10(11): 2124-2132.
240. Warfel NA, Newton AC. Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP): a new player in cell signaling. *J Biol Chem*. 2012 Feb 3; 287(6): 3610-6.

241. Wei Y, Du Y, Chen X, Li P, Wang Y, Zang W, Zhao L, Li Z, Zhao G. Expression patterns of microRNA-218 and its potential functions by targeting CIP2A and BMI1 genes in melanoma. *Tumour Biol.* 2014 Aug; 35(8): 8007-15.
242. Wei F, Ojo D, Lin X, Wong N, He L, Yan J, Xu S, Major P, Tang D. BMI1 attenuates etoposide-induced G2/M checkpoints via reducing ATM activation. *Oncogene*, 2015; 34: 3063-3075.
243. Wei X., He J., Wang J., Yang X., Ma B.: Bmi-1 is essential for the oncogenic potential in CD133+ human laryngeal cancer cells. *Tumour Biol.*, 2015; 36: 8931-8942.
244. Weng JH, Yu CC, Lee YC, Lin CW, Chang WW, Kuo YL. miR-494-3p Induces Cellular Senescence and Enhances Radiosensitivity in Human Oral Squamous Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 8; 17(7). pii: E1092.
245. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochemical Journal.* 2010. 428(2): 133–145.
246. Wojciechowska U, Czaderny K, Ciuba A, Olasek P, Didkowska J. Nowotwory Złośliwe w Polsce w 2016 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. Warszawa 2018.
247. Wu XM, Liu X, Bu YQ, Sengupta J, Cui HJ, Yi FP, Liu T, Yuan CF, Shi YY, Song FZ. RNAi-mediated silencing of the Bmi-1 gene causes growth inhibition and enhances doxorubicin-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Genet Mol Biol.* 2009 Oct; 32(4): 697-703.
248. Wu KJ, Yang MH. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection. *Biosci. Rep.*, 2011; 31: 449-455.
249. Wu Z, Min L, Chen D, Hao D, Duan Y, Qiu G, Wang Y. Overexpression of BMI-1 promotes cell growth and resistance to cisplatin treatment in osteosarcoma. *PLoS One.* 2011 Feb 2; 6(2): e14648.
250. Wu J., Hu D., Yang G., Zhou J., Yang C., Gao Y., Zhu Z.: Down-regulation of BMI-1 cooperates with artemisinin on growth inhibition of nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, 2011;112: 1938-1948.
251. Wu J, Hu D, Zhang R. Depletion of Bmi-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2012 Oct; 4(4): 723-726.
252. Wu SQ, Xu ZZ, Niu WY, Huang HB, Zhan R. ShRNA-mediated Bmi-1 silencing sensitizes multiple myeloma cells to bortezomib. *Int J Mol Med.* 2014 Aug; 34(2): 616-23.
253. Wu C, Zheng X, Li X, Fesler A, Hu W, Chen L, Xu B, Wang Q, Tong A, Burke S, Ju J, Jiang J. Reduction of gastric cancer proliferation and invasion by miR-15a mediated suppression of Bmi-1 translation. *Oncotarget.* 2016 Mar 22; 7(12): 14522-36.
254. Wu SQ, Niu WY, Li YP, Huang HB, Zhan R. miR-203 inhibits cell growth and regulates G1/S transition by targeting Bmi-1 in myeloma cells. *Mol Med Rep.* 2016 Nov; 14(5): 4795-4801.
255. Wu Y, Tian S, Chen Y, Ji M, Qu Y, Hou P. miR-218 inhibits gastric tumorigenesis through regulating Bmi-1/Akt signaling pathway. *Pathol Res Pract.* 2019 Feb; 215(2): 243-250.

256. Xia MY, Zhao XY, Huang QL, Sun HY, Sun C, Yuan J, He C, Sun Y, Huang X, Kong W, Kong WJ. Activation of Wnt/ β -catenin signaling by lithium chloride attenuates d-galactose-induced neurodegeneration in the auditory cortex of a rat model of aging. *FEBS Open Bio*. 2017 Apr 25; 7(6): 759-776.
257. Xiong D., Ye Y. Bmi-1 expression modulates non-small cell lung cancer progression. *Cancer biology&therapy*, 2015; 16(5): 756–763.
258. Xiong D, Ye Y, Fu Y, Wang J, Kuang B, Wang H, Wang X, Zu L, Xiao G, Hao M, Wang J. Bmi-1 expression modulates non-small cell lung cancer progression. *Cancer Biol Ther*. 2015; 16(5): 756-63.
259. Xiong X, Wen YA, Mitov MI, C Oaks M, Miyamoto S, Gao T. PHLPP regulates hexokinase 2-dependent glucose metabolism in colon cancer cells. *Cell Death Discov*. 2017 Jan 23; 3: 16103.
260. Xiong Y, Liu L, Qiu Y, Liu L. MicroRNA-29a Inhibits Growth, Migration and Invasion of Melanoma A375 Cells in Vitro by Directly Targeting BMI1. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 50(1): 385-397.
261. Xu Z, Liu H, Lv X, Liu Y, Li S, Li H. Knockdown of the Bmi-1 oncogene inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis and is involved in the decrease of Akt phosphorylation in the human breast carcinoma cell line MCF-7. *Oncol Rep*. 2011 Feb; 25(2): 409-18.
262. Xu L, Li Y, Yan D, He J, Liu D. MicroRNA-183 inhibits gastric cancer proliferation and invasion via directly targeting Bmi-1. *Oncol Lett*. 2014 Nov; 8(5): 2345-2351.
263. Xu XH, Liu XY, Su J, Li DJ, Huang Q, Lu MQ, Yi F, Ren JH, Chen WH. ShRNA targeting Bmi-1 sensitizes CD44⁺ nasopharyngeal cancer stem-like cells to radiotherapy. *Oncol Rep*. 2014 Aug; 32(2): 764-70.
264. Xu X, Liu Y, Su J, Li D, Hu J, Huang Q, Lu M, Liu X, Ren J, Chen W, Sun L. Downregulation of Bmi-1 is associated with suppressed tumorigenesis and induced apoptosis in CD44⁺ nasopharyngeal carcinoma cancer stem-like cells. *Oncol. Rep.*, 2016; 35: 923-931.
265. Xuan H, Xue W, Pan J, Sha J, Dong B, Huang Y. Downregulation of miR-221, -30d, and -15a contributes to pathogenesis of prostate cancer by targeting Bmi-1. *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Mar; 80(3): 276-83.
266. Yadav AK, Sahasrabudhe AA, Dimri M, Bommi PV, Sainger R, Dimri GP. Deletion analysis of BMI1 oncoprotein identifies its negative regulatory domain. *MolCancer*. 2010 Jun 22; 9:158.
267. Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, Ohtani N, Hara E, Maruyama M. Dysregulation of the Bmi-1/p16(Ink⁴a) pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. *Aging Cell*. 2015 Aug; 14(4): 616-24.
268. Yang J, Chai L, Liu F, Fink LM, Lin P, Silberstein LE, Amin HM, Ward DC, Ma Y. Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007; 104(25): 10494-10499.
269. Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, Huang CH, Kao SY, TzengCH, Tai SK, Chang SY, Lee OK, Wu KJ. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2010 Oct; 12(10): 982-92.

270. Yang F, Lv LZ, Cai QC, Jiang Y. Potential roles of EZH2, Bmi-1 and miR-203 in cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma cell line Hep3B. *World J Gastroenterol*. 2015 Dec 21; 21(47): 13268-76.
271. Yang PY, Hsieh PL, Wang TH, Yu CC, Lu MY, Liao YW, Lee TH, Peng CY. Andrographolide impedes cancer stemness and enhances radio-sensitivity in oral carcinomas via miR-218 activation. *Oncotarget*. 2017 Jan 17; 8(3): 4196-4207.
272. Yang XX, Ma M, Sang MX, Zhang XY, Liu ZK, Song H, Zhu SC. BMI-1 suppression increases the radiosensitivity of oesophageal carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep*. 2018 Feb; 39(2): 667-678.
273. Yang X, Wang J. The Role of Metabolic Syndrome in Endometrial Cancer: A Review. *Front Oncol*. 2019 Aug 8; 9:744.
274. Yao XB, Wang XX, Liu H, Zhang SQ, Zhu HL. Silencing Bmi-1 expression by RNA interference suppresses the growth of laryngeal carcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2013 May; 31(5): 1262-72.
275. Yin T, Wei H, Leng Z, Yang Z, Gou S, Wu H, Zhao G, Hu X, Wang C. Bmi-1 promotes the chemoresistance, invasion and tumorigenesis of pancreatic cancer cells. *Chemotherapy*, 2011; 57: 488-496.
276. Yoeli-Lerner M, Yiu GK RI, et al. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell*. 2005; 20: 539-550.
277. Yu CC, Lo WL, Chen YW, Huang PI, Hsu HS, Tseng LM, Hung SC, Kao SY, Chang CJ, Chiou SH. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *J Oncol*. 2011; 2011.
278. Yu J, Lu Y, Cui D, Li E, Zhu Y, Zhao Y, Zhao F, Xia S. miR-200b suppresses cell proliferation, migration and enhances chemosensitivity in prostate cancer by regulating Bmi-1. *Oncol Rep*. 2014 Feb; 31(2): 910-8.
279. Yu X, Jiang X, Li H, Guo L, Jiang W, Lu SH. miR-203 inhibits the proliferation and self-renewal of esophageal cancer stem-like cells by suppressing stem renewal factor Bmi-1. *Stem Cells Dev*. 2014 Mar 15; 23(6): 576-85.
280. Zaczek A, Józwiak P, Krześlak A. Participation of BMI-1 protein in cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017 Sep 20; 71(0): 811-824.
281. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.*, 2008; 68: 4311-4320.
282. Zhang X, Wei C, Li J, Liu J, Qu J. MicroRNA-194 represses glioma cell epithelial to mesenchymal transition by targeting Bmi1. *Oncol Rep*. 2017 Mar; 37(3): 1593-1600.
283. Zhang Y, Zhou SY, Yan HZ, Xu DD, Chen HX, Wang XY, Wang X, Liu YT, Zhang L, Wang S, Zhou PJ, Fu WY, Ruan BB, Ma DL, Wang Y, Liu QY, Ren Z, Liu Z, Zhang R, Wang YF. miR-203 inhibits proliferation and self-renewal of leukemia stem cells by targeting survivin and Bmi-1. *Sci Rep*. 2016 Feb 5; 6: 19995.
284. Zhang X, Guo W, Wang X, Liu X, Huang M, Gan L, Cheng Y, Li J. Antitumor activity and inhibitory effects on cancer stem cell-like properties of Adeno-associated virus (AAV) -mediated Bmi-1 interference driven by Bmi-1 promoter for gastric cancer. *Oncotarget*. 2016 Apr 19; 7(16): 22733-45.

285. Zhang Z, Wang Q, Bu X, Zhang C, Chen H, Sha W, Liu W. Overexpression of Bmi-1 promotes epithelial-mesenchymal transition in CD133+Hep G2 cells. *Mol Med Rep.* 2017 Nov; 16(5): 6156-6161.
286. Zheng Z, Bao F, Chen X, Huang H, Zhang X. MicroRNA-330-3p Expression Indicates Good Prognosis and Suppresses Cell Proliferation by Targeting Bmi-1 in Osteosarcoma. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 46(2): 442-450.
287. Zhu Y, Yu F, Jiao Y, Feng J, Tang W, Yao H, Gong C, Chen J, Su F, Zhang Y, Song E. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induce chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 15; 17(22): 7105-15.
288. Zhou Y, Zhang L, Pan H, Wang B, Yan F, Fang X, Munnee K, Tang Z. Bmi1 essentially mediates podocalyxin-enhanced Cisplatin chemoresistance in oral tongue squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2015 Apr 27; 10(4): e0123208.
289. Zhou J, Yu X, Wang J, Li T, Jin T, Lei D, Pan X. Aberrant expression of PHLPP1 and PHLPP2 correlates with poor prognosis in patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2015 Mar 20; 10(3): e0119405.