

## Streszczenie

Jednym z podstawowych sposobów epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest metylacja reszt cytozyny w DNA (powstaje 5-metylocytozyna). Określony wzór metylacji DNA zależy nie tylko od przebiegu samego procesu przyłączania grup metylowych do reszt cytozyny, ale jest również wynikiem procesu pasywnej i aktywnej demetylacji DNA. Istotną rolę w demetylacji DNA odgrywają białka TET (ten-eleven translocation), których aktywność enzymatyczna polega na hydroksylacji, czyli dodaniu do cząsteczki związku grupy hydroksylowej (-OH), 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny. W komórkach człowieka zidentyfikowano trzy białka TET określone jako TET1, TET2 i TET3, kodowane przez trzy różne geny. W przypadku wielu typów nowotworów stwierdza się zaburzoną ekspresję i aktywność białek TET. Wyniki przeprowadzonych badań ujawniły, że TET3 w raku endometrium zachowuje się odmiennie od pozostałych członków rodziny TET. Podczas gdy ekspresja *TET1* i *TET2* malała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu, to ekspresja *TET3* wzrastała. Dodatkowo, udział białek TET w regulacji ekspresji genów nie ogranicza się tylko do ich enzymatycznej aktywności. Białka TET mogą bowiem wchodzić w interakcje z białkami uczestniczącymi w modyfikacjach histonów. Jednym z białek, z którym oddziałują białka TET jest enzym O-GlcNAc transferaza (OGT). Aktywność OGT polega na przyłączaniu pojedynczych reszt cukru (N-acetyloglukozaminy) do białek, a proces ten nosi nazwę O-GlcNAcytacji. Zwiększona ekspresja genu kodującego OGT, jak również nasilony poziom O-GlcNAcytacji są cechami charakterystycznymi wielu typów nowotworów. Białka TET mogą oddziaływać z OGT umożliwiając jej transport do chromatyny, gdzie modyfikuje białka histonowe. W związku z tym kompleks OGT-TET może mieć istotny wpływ na regulację ekspresji genów. Mimo, iż wszystkie trzy białka TET wpływają na rekrutację OGT do chromatyny, sugeruje się, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko TET3.

Celem rozprawy było określenie związku pomiędzy ekspresją genów *TET* i *OGT* a progresją raka endometrium oraz wpływu wzajemnych oddziaływań między TET3 i OGT na regulację ekspresji genów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym oraz zdolność komórek raka endometrium do inwazji i przerzutowania. Badania przeprowadzono wykorzystując tkanki prawidłowe błony śluzowej macicy i tkanki nowotworowe endometrium oraz linie komórkowe raka endometrium – HEC-1A i Ishikawa.

Uzyskane wyniki badań przeprowadzonych na tkankach pobranych od pacjentek z rakiem endometrium i tkankach kontrolnych wskazują, że poziomy transkryptów *TET1* i *TET2*, ale nie

*TET3* są zmniejszone i skorelowane z poziomami 5-hmC. Ponadto, obniżenie ekspresji *TET1* może być potencjalnym markerem prognostycznym w raku endometrium.

Wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych wskazują, że istnieje współzależność między *TET3* i *OGT*, szczególnie w przypadku nowotworu endometrium. Interakcje między tymi dwoma białkami odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne oraz genów wpływających na zdolność komórek do inwazji i przerzutowania. Uzyskane wyniki, wskazują jednak na złożony i komórkowo specyficzny charakter interakcji między *TET3* a *OGT* i w związku z tym potrzebne są dalsze badania, mające na celu określenie kontekstu molekularnego i wytypowanie dodatkowych czynników mogących wpływać na aktywność tych białek. Pełne zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację potencjału inwazyjnego i metastatycznego komórek są niezbędne do opracowania skutecznych strategii leczenia i monitorowania postępu choroby nowotworowej, a uzyskane podczas realizacji rozprawy dane wskazują, że zależność między *TET3* i *OGT* może mieć istotne znaczenie w przypadku raka endometrium.



## **Abstract**

One of the basic methods of epigenetic regulation of gene expression is the methylation of cytosine residues in DNA (5-methylcytosine is produced). A specific DNA methylation pattern depends not only on the process of attaching methyl groups to cytosine residues, but is also the result of the process of passive and active DNA demethylation. An important role in DNA demethylation is played by TET (ten-eleven translocation) proteins, whose enzymatic activity involves hydroxylation, i.e. adding a hydroxyl group (-OH), 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, to the compound molecule. Three TET proteins have been identified in human cells, termed TET1, TET2 and TET3, encoded by three different genes. In many types of cancer, impaired expression and activity of TET proteins is found. The results of the conducted research revealed that TET3 behaves differently in endometrial cancer than other members of the TET family. While the expression of *TET1* and *TET2* decreased with increasing tumor stage, the expression of *TET3* increased. Additionally, the participation of TET proteins in the regulation of gene expression is not limited only to their enzymatic activity. TET proteins may interact with proteins involved in histone modifications. One of the proteins with which TET proteins interact is the enzyme O-GlcNAc transferase (OGT). OGT activity involves the attachment of single sugar residues (N-acetylglucosamine) to proteins, and this process is called O-GlcNAcylation. Increased expression of the gene encoding OGT as well as increased levels of O-GlcNAcylation are characteristic features of many types of cancer. TET proteins can interact with OGT, allowing it to be transported to chromatin, where it modifies histone proteins. Therefore, the OGT-TET complex may have a significant impact on the regulation of gene expression. Although all three TET proteins influence the recruitment of OGT to chromatin, it is suggested that the TET3 protein plays a key role in this process. The aim of the dissertation was to determine the relationship between the expression of *TET* and *OGT* genes and the progression of endometrial cancer, as well as the impact of the interactions between TET3 and OGT on the regulation of the expression of genes related to the epithelial-mesenchymal transition and the ability of endometrial cancer cells to invade and metastasize. The research was carried out using normal tissues of the uterine mucosa and endometrial cancer tissues, as well as endometrial cancer cell lines - HEC-1A and Ishikawa. The results of studies carried out on tissues collected from patients with endometrial cancer and control tissues indicate that the levels of TET1 and TET2 transcripts, but not TET3, are reduced and correlated with the levels of 5-hmC. Moreover, the reduction of TET1 expression may be a potential prognostic marker in endometrial cancer. The results of studies conducted on cell lines indicate that there is a correlation between TET3 and OGT, especially in the case of endometrial cancer.

The interactions between these two proteins play a role in regulating the expression of genes involved in the epithelial-mesenchymal transition and genes influencing the ability of cells to invade and metastasize. However, the obtained results indicate the complex and cell-specific nature of the interactions between TET3 and OGT, and therefore further research is needed to determine the molecular context and identify additional factors that may influence the activity of these proteins. A complete understanding of the mechanisms responsible for regulating the invasive and metastatic potential of cells is necessary to develop effective treatment strategies and monitoring the progression of cancer, and the data obtained during the dissertation indicate that the relationship between TET3 and OGT may be important in the case of endometrial cancer.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'C. Guilla', is located to the right of the main text block.