Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Sveučilište u Dubrovniku Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Marko Tomljanović

TRIMETILACIJA LIZINA 27 U HISTONU H3 (H3K27ME3) U ODGOVORU STANICA RAKA NA CISPLATINU U UVJETIMA *IN VITRO*

Doktorski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Sveučilište u Dubrovniku Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Marko Tomljanović

TRIMETILACIJA LIZINA 27 U HISTONU H3 (H3K27ME3) U ODGOVORU STANICA RAKA NA CISPLATINU U UVJETIMA *IN VITRO*

Doktorski rad

Doktorski rad predložen

Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti

Osijek, 2023.

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za epigenomiku, Zavod za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Koraljke Gall Trošelj. Doktorski rad izrađen je u sklopu projekta HRZZ-IP-2016-06-4404 (CrossEMPATICNRF2) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Sveučilište u Dubrovniku Institut Ruđer Bošković Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti Znanstvena polja: Biologija i Temeljne medicinske znanosti

TRIMETILACIJA LIZINA 27 U HISTONU H3 (H3K27ME3) U ODGOVORU STANICA RAKA NA CISPLATINU U UVJETIMA *IN VITRO*

Marko Tomljanović

Doktorski rad je izrađen u: Laboratorij za epigenomiku, Zavod za molekularnu medicinu Instituta

Ruđer Bošković u Zagrebu, Hrvatska

Mentor/i: Naslovna prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, dr. med.

Kratki sažetak doktorskog rada:

Na linijama stanica podrijetlom od raka glave i vrata (Detroit 562 i FaDu) te raka debelog crijeva (HT-29), istražen je učinak kombinirane primjene cisplatine sa spojevima koji, u odnosu na represivni epigenetički biljeg, trimetilaciju lizina 27 u histonu H3 (H3K27me3), imaju antagonistički učinak. Tazemetostatom se postavljanje H3K27me3 inhibira, a GSK-J4 sprečava uklanjanje ove oznake. Učinci su istraženi primjenom funkcionalnih staničnih testova. Primjenom standardnih molekularno-genetičkih metoda, neki od opaženih fenomena objašnjeni su na molekulskoj razini.

Broj stranica: 171 Broj slika: 57 Broj tablica: 13 Broj literaturnih navoda: 305 Jezik izvornika: hrvatski Ključne riječi: proliferacija, apoptoza, cisplatina, tazemetostat, GSK-J4, P21, TGF-β1, ciklin D2 Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Naslovna doc. dr. sc. Ana Čipak Gašparović, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, predsjednica povjerenstva

2. Naslovna prof. dr. sc. Sanja Kapitanović, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju Instituta Ruđer Bošković, član

3. Prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član

4. Naslovna doc. dr. sc. Tanja Matijević Glavan, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, zamjena člana

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb;Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek University of Dubrovnik Ruđer Bošković Institute University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular Biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary area of science Scientific Fields: Biology and Basic medical sciences

TRIMETHYLATION OF HISTONE H3 LYSINE 27 (H3K27ME3) IN CANCER CELLS RESPONSE TO CISPLATIN IN VITRO

PhD thesis

Marko Tomljanović

Thesis performed at: Laboratory for Epigenomics, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

Supervisor/s: Professor Koraljka Gall Trošelj, MD, PhD

Short abstract:

Cell lines originating from head and neck cancer (Detroit 562 and FaDu) and colon cancer (HT-29) were used as models for exploring the effect of combined application of cisplatin and compounds that have antagonistic effect on repressive epigenetic mark, trimethylation of lysine 27 in histone H3 (H3K27me3). Tazemetostat inhibits establishment of H3K27me3, while GSK-J4 prevents removal of this mark. The effects of treatments were analyzed by functional cellular test. Some of the phenomena observed were explained at the molecular level, through routinely applied methods of molecular biology.

Number of pages: 171 Number of figures: 57 Number of tables: 13 Number of references: 305 Original in: Croatian Key words: proliferation, apoptosis, cisplatin, tazemetostat, GSK-J4, P21, TGF-β1, Cyclin D2

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Ana Čipak Gašparović, PhD, Senior research associate at the Ruđer Bošković Institute, President of the review committee

- 2. Sanja Kapitanović, PhD, Senior scientist with tenure at the Ruđer Bošković Institute, reviewer
- 3. Vera Cesar, PhD, Full professor at the Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, reviewer
- 4. Tanja Matijević Glavan, PhD, Senior research associate at the Ruđer Bošković Institute, substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Koraljki Gall Trošelj na ukazanom povjerenju i vodstvu tijekom doktorskog studija i izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za epigenomiku za pruženu pomoć i savjete prilikom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem svim kolegicama i kolegama na Institutu Ruđer Bošković, naročito kolegama iz Laboratorija za oksidacijski stres i Laboratorija za personaliziranu medicinu, za pružene savjete i pomoć u radu.

I na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom cijelog života.

SADRŽAJ POPIS KRATICA

1.UVOD	1
1.1. Epigenetika	1
1.1.1. Metilacija molekule DNA	1
1.1.1.1. Uspostava metilacije molekule DNA	2
1.1.1.2. Demetiliranje molekule DNA	3
1.1.2. Posttranslacijske modifikacije histona	4
1.1.2.1. Acetilacija histona	5
1.1.2.3. Metilacija histona	6
1.1.2.4. Metilacija H3K27	7
1.1.2.5. Histon lizin metiltransferaza EZH2	8
1.1.2.6. Histon lizin demetilaza KDM6A	9
1.1.2.7. Histon lizin demetilaza KDM6B1	1
1.2. Epigenetičke promjene u zloćudno preobraženoj stanici1	3
1.2.1. Osobitosti EZH2 u zloćudnim tumorima1	4
1.2.2. Osobitosti KDM6A u zloćudnim tumorima1	6
1.2.3. Osobitosti KDM6B u zloćudnim tumorima1	9
1.3. Temeljna obilježja stanice raka ovisna su o višestrukim genskim promjenama2	1
1.3.1. Ciklin D22	1
1.3.2. Transformirajući čimbenik rasta beta 12	3
1.3.2.1. Zloćudni tumori i signalni put posredovan transformirajućim čimbenikom rasta beta	5
1.4. Senzibiliziranje stanice na cisplatinu farmakološkim moduliranjem razine H3K27me3	6
1 4 1 Tazemetostat inhibitor EZH2	6
1.4.2 GSK I4 inhibitor KDM6A i KDM6B	7
1.4.2. Cisplatina	8
2 CILLISTDAŽIVANIJA 2	0
2. CILJ ISTRAZIVANJA	1
3. MATERIJALI I METODE	1
2.1.1 Liniio storioo	1
3.1.1. Limje stanica	1
3.1.2. Iviaterijan i kennkanje za uzgoj stanica	ו ר
3.1.3. Konstena otapata i spojevi	2 2
J.1.4. Majerenje vijaonnosu i promeracije stanica	4

2.1.5. Odrađivanja staničnog ciklusa i anontoza	22
2.1.6. Izdvojenje vlavne DNA i prožičávanje od zaostale generalke DNA	
3.1.0. izuvajanje ukupne KIVA i prociscavanje od zaostale genomske DIVA	
3.1.7. Obinuto prepisivanje	
2.1.0. Lančana reakcija polimeraze u stvernom vromonu (PT aPCP) i TacMan (
Expression Array	
3.1.10. Izdvajanje proteina i određivanje njihove koncentracije	34
3.1.11. Western blot	35
3.1.12. Imunofluorescencija	
3.2. METODE	
3.2.1. Uzgoj stanica	
3.2.2. Određivanje vijabilnosti i proliferacije stanica	40
3.2.2.1. Mjerenje vijabilnosti stanica	40
3.2.2.2. Određivanje proliferacije stanica	41
3.2.4. Analiza staničnog ciklusa	42
3.2.5. Analiza apoptoze	43
3.2.6. Izdvajanje ukupne RNA	44
3.2.7. Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izdvojene RNA	44
3.2.8. Uklanjanje genomske DNA iz uzoraka RNA i obrnuto prepisivanje	45
3.2.9. RT-PCR (konzervativna lančana reakcija polimeraze ("end-point PCR")).	46
3.2.10. Probir transkripata korištenjem pločica TaqMan Gene Expression Array	Plates46
3.2.11. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	47
3.2.12. Izdvajanje ukupnih proteina i proteina jezgre/citoplazme	
3.2.12.1. Ukupni proteini	
3.2.12.2. Proteini citoplazme i jezgre	
3.2.13. Određivanje koncentracije proteina	49
3.2.14. Analiza proteina metodom Western blot	
3.2.15. Imunofluorescencija – H3K27me3	
3.2.16. Statistička obrada podataka	
4. REZULTATI	
4.1. Pregled svih dostupnih podataka: kombinirana primjena cisplatine i utišavanja/inhibiranja EZH2	52
4.2. Pregled svih dostupnih podataka: kombinirana primjena cisplatine i	
utišavanja/inhibiranja KDM6A i KDM6B	54
4.3. Uspostavljanje eksperimentalnih uvjeta	
4.3.1. Vijabilnost stanica u odnosu na koncentraciju i vrijeme izlaganja cisplatin	i55

4.3.2. Koncentracija tazemetostata	58
4.3.3. Vijabilnost stanica nakon izlaganja cisplatini i tazemetostatu	58
4.3.4. Proliferacija stanica nakon izlaganja cisplatini i tazemetostatu	62
4.3.5. Koncentracija GSK-J4	63
4.3.6. Razina oznake H3K27me3	64
4.3.7. Proliferacija stanica	68
4.4. Stupanj apoptoze	69
4.5. Faze staničnog ciklusa	74
4.6. Izdvajanje i pročišćavanje ukupne RNA i obrnuto prepisivanje	81
4.7. Probir transkripata – pločice TaqMan	85
4.8. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR)	89
4.9. Analiza proteina - Western blot	92
4.9.1. Protein P21	94
4.9.2. Protein P53	97
4.9.3. Protein ciklin D2	100
4.9.4. Protein TGFB1	103
4.9.5. Protein EZH2	106
4.9.6. Protein KDM6B	109
5. RASPRAVA	112
5.1. Uspostavljanje eksperimentalnih uvjeta i funkcionalni stanični testovi	113
5.1.1. Uspostava eksperimentalnog modela na temelju mjerenja vijabilnosti s cisplatina i tazemetostat	tanica: 113
5.1.1.1. Cisplatina	113
5.1.1.2. Tazemetostat	114
5.1.1.3. Cisplatina i tazemetostat	115
5.1.2. Proliferacija stanica: cisplatina i tazemetostat	117
5.1.3. Određivanje koncentracije GSK-J4	119
5.1.4. Utjecaj tazemetostata i GSK-J4 na razinu H3K27me3	119
5.1.5. Značajne promjene proliferacije u pojedinim eksperimentalnim uvjetin	na120
5.2. Stupanj apoptoze u pojedinim eksperimentalnim uvjetima	121
5.3. Eksperimentalni uvjeti i stanični ciklus	123
5.4. Molekularno-genetičke analize transkripata i proteina	126
5.4.1. CDKN1A (P21) i P53	127
5.4.2. Ciklin D2	131
5.4.3. TGFB1	133

5.4.4. EZH2	
5.4.5. KDM6B	
6. ZAKLJUČCI	
7. LITERATURA	
8. SAŽETAK	
9. SUMMARY	
10. ŽIVOTOPIS	
11. POPIS PUBLIKACIJA	

POPIS KRATICA

ADP	Adenozin difosfat
AEBP2	od engl. Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2
AID	od engl. Activation-Induced Deaminase
AOX1	od engl. Aldehyde Oxidase 1
APOBEC1	od engl. Apolipoprotein B mRNA-Editing Enzyme 1
ATCC	od engl. American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
BAX	od engl. BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BMP	od engl. Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Bromodeoksiuridin
BSA	Albumin seruma goveda od engl. Bovine Serum Albumin
CBP	od engl. CREB-binding protein
CBP	od engl. CREB-binding protein
CCND2	Gen ciklin D2
CDK	Ciklin ovisna kinaza, od engl. Cycline Dependent Kinase
CDK2	Ciklin ovisna kinaza 2
CDKN1A	od engl. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A	od engl. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CDKN2B	od engl. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B
CEBPA	od engl. CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
COSMIC	od engl. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CXCR4	od engl. Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4
DBS	od engl. Double Strand Brake
DMEM	od engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNMT	DNA metiltransferaza
DOT1	od engl. Disruptor of Telomeric Silencing 1
EBV	Virus Epstein-Barr
Ect2l	od engl. Epithelial Cell Transforming Sequence 2 Oncogene-like
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
EED	od engl. Embryonic Ectoderm DevelopmentProtein
ELISA	od engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELK1	od engl. ETS Transcription Factor ELK1
ERα	Receptor za estrogen alfa
EZH1	od engl. Enhancer of Zeste Homolog 1
EZH2	od engl. Enhancer of Zeste Homolog 2
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FCS	od engl. Fetal Calf Serum
FDA	od engl. U.S. Food and Drug Administration
FOS	od engl. Fos Proto-oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
FSH	Folikularni stimulirajući hormon, od engl. Follicle-stimulating Hormone
H3K27	Lizin na položaju 27 u histonu H3

H3K9	Lizin na položaju 9 u histonu H3
H4K16	Lizin na položaju 16 u histonu H4
HDAC	Histon deacetilaze (od engl. Histone Deacetylase)
HPV	Papilomavirus čovjeka (od. engl. Human Papillomavirus)
IGF2	od engl. Insulin Like Growth Factor 2
IL-6	Interleukin 6
JARID2	od engl. Jumonji/ARID Domain-Containing Protein 2
JMJD3	od engl. JmjC domain-containing protein 3
KDM6A	Lizin specifična demetilaza 6A
KDM6B	Lizin specifična demetilaza 6B
KDM6C	Lizin specifična demetilaza 6C
LAP	od engl. Latency Associated Peptide
LLC	od engl. Large Latent TGF-β Complex
LMP1	od engl. Latent Membrane Protein 1
lncRNA	Dugačka nekodirajuća RNA (od engl. Long Non-Coding RNA)
LPS	Lipopolisaharid
LSD1	od engl. Lysine Specific Demethylase1
LTBP	od engl. Latent TGF-β Binding Protein
MAPK	od engl. Mitogen-activated Protein Kinase
MBD	od engl. Methyl-CpG-binding Domain
M-CSF	od engl. MacrophageColony Stimulating Factor
MeCP2	od engl. Methyl-CpG-binding Protein 2
miRNA	Mikro RNA
Mixl1	od engl. Mix1 Homeobox-like 1
MIZ1	od engl. Myc-interacting Zinc Finger Protein 1
MLL4	od engl. Myeloid/lymphoid or Mixed-lineage Leukemia Protein 4
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYT1	od engl. Myelin Transcription Factor 1
NAPDH	od engl. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NCBI	od engl. National Center for Biotechnology Information
NER	od engl. Nucleotide Excision Repair
NF1	od engl. Neurofibromin 1
NF-ĸB	od engl. Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells
NLS	od engl. Nuclear Localization Signal
NOD-SCID	od engl. Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
NOTCH1	od engl. Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
OS	od engl. Overal Survival
PBS	od engl. Phosphate Buffer Saline
PCL	od engl. Polycomb-like Proteins
PCNA	od engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Lančana reakcija polimerazom
piRNA	od engl. Piwi-Interacting RNA
PPP	Put pentoza fosfata, eng. Pentose Phosphate Pathway
pRB-E2F	od engl. Retinoblastoma-Associated Protein - Transcription Factor E2F

od engl. Polycomb Repressive Complex 1
od engl. Polycomb Repressive Complex 2
od engl. Retinoblastoma-Associated Proteins p46/p48
Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
S-adenozil-L-metionin (od engl. S-Adenosyl-L-methionine)
Domena proteina Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax
od engl. Small Latent TGF-β Complex
od engl. Mothers Against Decapentaplegic (MAD) Homolog
od engl. Specificity Protein 1
od engl. Signal Transducer and Activator of Transcription 3
od engl. Small Ubiquitin-like Modifier
od engl. Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog
od engl. SWItch/Sucrose Non-Fermentable
od engl. Tris-acetate-EDTA
od engl. TBP-associated Factor 250 kDa (p250)
od engl. T Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1
Akutna limfoblastična lekemija T-stanica
od engl. Tris-buffer saline, 0,1% Tween 20
od engl. Ten-Eleven Translocation
od engl. Transcription factor II D
od engl. Transforming Growth Factor Beta 1
od engl. Tumor Necrosis Factor
Tumor protein p53
od engl. Tetratricopeptide Repeat
od engl. Transcriptional Repression Domain
Tazemetostat
od engl. Ubiquitin-like, Containing PHD and RING Finger Domain
od engl. Ubiquitously-Transcribed TPR Protein on the X Chromosome
od engl. Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Containing, Y-linked
od engl. Vasohibin 1
od engl. Vascular Endothelial Growth Factor

1.UVOD

1.1. Epigenetika

Epigenetika je grana znanosti vezana uz istraživanje promjena ispoljavanja gena koje nisu posljedica promjena slijeda nukleotida u molekuli DNA [1]. Epigenetičke promjene ili modifikacije ključne su u kontroli ispoljavanja gena. Izravno i/ili neizravno utječu na svaki proces koji se odvija u stanici. Epigenetičke promjene odgovorne su i za razlikovno, u određenim vremenskim intervalima specifično ispoljavanje gena, što je osnova za diferencijaciju; složeni proces tijekom kojeg iz oplođene jajne stanice nastaju sve vrste stanica u složenim organizmima [2, 3].

Epigenetičke modifikacije nužne su za pravilno ispoljavanje upisanih gena (od engl. *Imprinted Genes*), koji se ispoljavaju sa samo jednog kromosoma, nasljeđenog od majke ili od oca [4]. Još jedan primjer važnosti epigenetike u reguliranju ispoljavanja gena jest nasumična inaktivacija jednog od kromosoma X u stanicama ženki viših sisavaca, s ciljem regulacije razine produkata gena smještenih na kromosomu X, u odnosu na stanice mužjaka. Središnju ulogu u ovom procesu ima nekodirajuća RNA *Xist* koja se veže na kromosom X predviđen za inaktivaciju te posreduje vezanju enzima koji postavljaju druge inaktivirajuće epigenetičke oznake, što u konačnici dovodi do inaktivacije kromosoma [5]. Različiti epigenetički mehanizmi uključeni su u utišavanje retrotranspozona prisutnih u genomu sisavaca, čime se spriječava njihova aktivacija i ugradnja na nova mjesta u genomu, što u konačnici može pridonijeti genomskoj nestabilnosti stanica [6, 7].

Nekoliko je različitih modifikacija ili procesa koji se smatraju "epigenetičkima": metilacija molekule DNA, posttranslacijske modifikacije histona, dugačke nekodirajuće RNA (lncRNA, od engl. *Long Non-Coding RNA*), mikro RNA (miRNA), piRNA (od engl. *Piwi-Interacting* RNA) i remodeliranje nukleosoma [8, 9]. Najdetaljnije istraženi epigenetički mehanizmi su metilacija molekule DNA i posttranslacijske modifikacije histona.

1.1.1. Metilacija molekule DNA

U stanicama sisavaca se termin "metilacija DNA" tradicionalno odnosi na metilaciju citozina u dinukleotidu CpG [10], pri čemu "p" označava fosfatnu vezu. Prikaz naglašava da se radi o dva uzastopna nukleotida u lancu molekule DNA, a ne o komplementarnom sparivanju baza. Citozin se metilira na položaju 5 pirimidinskog prstena; nastaje 5-metilcitozin. Reakciju

metilacije, tj. prijenosa metilne skupine s kofaktora S-adenozil-L-metionina (SAM, od engl. *S-Adenosyl-L-methionine*) na citozin kataliziraju enzimi DNA metiltransferaze (DNMT, od engl. *DNA Methyltransferases*).

1.1.1.1. Uspostava metilacije molekule DNA

Genom čovjeka sadrži pet gena koji kodiraju DNA metil transferaze: *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *DNMT3L*. Samo su tri enzima katalitički aktivna: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. Proteini DNMT2 i DNMT3L, iako katalitički neaktivni, imaju regulatorne uloge u procesu metilacije molekule DNA [11]. Katalitički aktivne DNA metiltransferaze tradicionalno se dijele u dvije skupine: DNMT1 koja je odgovorna za održavanje obrasca i razine metilacije molekule DNA prilikom diobe stanica te DNMT3A i DNMT3B koje imaju sposobnost metiliranja lanca molekule DNA *de novo*.

Enzim DNMT1 ispoljen je u većini tkiva sisavaca i ima afinitet prema dvolančanoj molekuli DNA, u kojoj je metiliran samo jedan lanac (hemimetilirana DNA), dok je novonastali lanac, koji nastaje replikacijom molekule DNA, nemetiliran. DNMT1 se veže za hemimetilirani lanac molekule DNA i metilira novonastali lanac, pri čemu se održava originalan uzorak metilacije molekule [12]. Mutacije koje uzrokuju gubitak funkcije gena *DNMT1* nisu spojive sa životom [13].

Enzimi DNMT3A i DNMT3B odgovorni su za većinu novih obrazaca metilacije DNA (*de novo*). Ova dva enzima imaju visok stupanj homologije: DNA metiltransferaza DNMT3A ispoljena je u većini tkiva, dok je razina DNMT3B niska u svim tkivima, osim u tkivima sjemenika, štitnjače i koštane srži [14]. Miševi s inaktivirajućim mutacijama u genu *Dnmt3b* ugibaju tijekom embrionalnog razvoja, dok miševi s mutacijama *Dnmt3a* ugibaju u četvrtom postnatalnom tjednu. Ovi podatci upućuju na to da ova dva enzima imaju ključne, ali različite uloge, tijekom embrionalnog i postnatalnog razvoja sisavaca [15].

U genomu kralježnjaka učestalost dinukleotida CpG, na kojima se može metilirati molekula DNA, značajno je smanjena u odnosu na ostale dinukleotide; samo 20% od očekivane. Smatra se da je razlog ovoj smanjenoj učestalosti smanjena stabilnost metiliranih citozina od kojih mogu, zbog spontane deaminacije, nastajati timini [16, 17]. Većina dinukleotida CpG (60-80%) u genomu čovjeka je metilirana. Izuzetak su dinukeotidi koji se nalaze u dijelovima genoma koji se nazivaju otocima CpG (engl. *CpG Islands*) [18]. Otoci CpG su dijelovi genoma, u prosjeku dugački 1000 parova baza, koji imaju povećani udio parova baza "GC", kao i

nemetiliranih dinukeotida CpG. Velik broj otoka CpG nalazi se u promotorima gena. Razina njihove metiliranosti ima važnu ulogu u ispoljavanju ovih gena [18].

Kao što je ranije navedeno, metilacija molekule DNA ima ključnu ulogu u reguliranju ispoljavanja upisanih gena, inaktivaciji kromosoma X, utišavanju retrotranspozona i, posljedično, očuvanju stabilnosti genoma [19, 20].

Postoje tri skupine proteina koji se mogu se vezati na DNA, u području u kojem se nalaze metilirani citozini: proteini MBD (od engl. *Methyl-CpG-binding Domain*), proteini UHRF (od engl. *Ubiquitin-like, Containing PHD and RING Finger Domain*), i proteini koji sadrže domenu cinkovih prstiju (engl. *Zinc Finger Proteins*) [21]. Proteini MBD prvi su otkriveni i njihova uloga najbolje je istražena. Prvi otkriveni protein ove skupine (1992. godine) je MeCP2 (od engl. *Methyl-CpG-binding Protein 2*) koji sadrži domenu MBD. Ova domena, koja je ključna za funkciju ove obitelji proteina, sastoji se od 85 amino kiselina i specifično se veže samo za metiliranu molekulu DNA [22]. Kasnije su identificirana još četiri proteina koji posjeduju cjelovitu domenu MBD: MBD1, MBD2, MBD3 i MBD4 [23]. Proteini MeCP2, MBD1 i MBD2 posjeduju domene TRD (od engl. *Transcriptional Repression Domain*) pomoću kojih mogu stupiti u interakciju s drugim proteinima koji dovode do represije transkripcije gena, na primjer, s histon deacetilazama (HDAC, od engl. *Histone Deacetylase*) [24, 25].

1.1.1.2. Demetiliranje molekule DNA

Uklanjanje metilacijske oznake na molekuli DNA može se odvijati na dva načina, pasivno i aktivno. Pasivno uklanjanje metilacije događa se prilikom diobe stanica. Prilikom sinteze novog lanca molekule DNA, enzim DNMT1 metilira novonastali lanac. U slučaju utišavanja ili inhibicije DNMT1, izostaje metilacija novonastalog lanca. Kontinuirane diobe stanica dovest će, u tom scenariju, do gubitka metilacije, zbog "razrjeđivanja" metiliranih lanaca.

Aktivna demetilacija molekule DNA odvija se posredstvom enzima. Jedan od mehanizama je deaminacija metiliranog citozina, pri čemu dolazi do prijelaza metiliranog citozina u timin. S obzirom na to da se u molekuli DNA timin ne može komplementarno spariti s gvaninom, ovo pogrešno sparivanje prepoznaju enzimi odgovorni za popravak molekule DNA izrezivanjem baza. Nukleotid koji sadrži krivo sparenu bazu timin uklanja se iz molekule DNA i zamjenjuje se nemetiliranim citidinom. Enzimi koji mogu deaminirati citozin su proteini AID (od engl.

Activation-Induced Deaminase) i APOBEC1 (od engl. Apolipoprotein B mRNA-Editing Enzyme 1) [26].

Drugi mehanizam posredovan je proteinima TET (od engl. *Ten-Eleven Translocation*). Genom čovjeka sadrži tri gena TET: *TET1, TET2, TET3*. Ovi enzimi kataliziraju reakciju oksidacije metilne skupine 5-metilcitozina u nekoliko koraka, pri čemu nastaju: 5-hidroksimetilcitozin, potom 5-formilcitozin te u konačnici 5-karboksicitozin. Proteini uključeni u popravak molekule DNA izrezivanjem baza prepoznaju 5-formilcitozin i 5-karboksicitozin i uklanjaju ih, a na njihovo mjesto se ugrađuje nemetilirani citidin [27].

1.1.2. Posttranslacijske modifikacije histona

U stanicama eukariota molekula DNA se veže s proteinima histonima, tvoreći kromatin. Temeljna jedinica kromatina je nukleosom koji se sastoji od osam proteina histona koji čine jezgru nukleosoma (po dva proteina histona H2A, H2B, H3 i H4) oko kojih je omotano 146 parova baza DNA [28]. Nukleosomi su međusobno povezani kratkim slijedom DNA (engl. Linker DNA) na koji se veže histon H1, koji nije sastavni dio nukleosoma. Ova osnovna struktura kromatina, debljine 10 nm, pod elektronskim mikroskopom nalikuje na nanizane bisere, pa otuda i naziv "perle na niti" (engl. "Beads on a String"). Ova struktura kromatina, koja dozvoljava vezanje čimbenika transkripcije i transkripcijske mašinerije stanice što omogućuje transkripciju gena, naziva se "otvoreni kromatin" ili eukromatin. Kondenzacijom osnovne strukture kromatina nastaje sekundarna struktura, kromatinska vlakna, debljine 30 nm. Kromatinska vlakna mogu se dodatno "pakirati" u još kompaktnije, tercijarne, oblike kromatina. Zgusnuta struktura kromatina ima ključni utjecaj na transkripciju, budući da ograničava pristup čimbenicima transkripcije i cjelokupnoj transkripcijskoj mašineriji stanice ciljnim sljedovima DNA [29, 30]. Osim transkripcije, struktura kromatina ima ulogu u replikaciji i popravku molekule DNA. Zgusnuti dijelovi kromatina nazivaju se još i heterokromatinom. Heterokromatin se dalje može podijeliti na konstitutivni i fakultativni heterokromatin. Konstitutivni heterokromatin obično ne sadrži gene i njegov smještaj u genomu istovjetan je u svim stanicama organizma. Nasuprot tome, fakultativni heterokromatin sadrži gene koji su utišani tijekom diferencijacije stanica i specifičan je za pojedinu vrstu stanice u organizmu [31].

N-terminalni dio histona je u obliku lanca neorganizirane strukture koji "strši" iz nukleosoma i stupa u interakciju s drugim nukleosomima i molekulom DNA. Ovi dijelovi histona mogu se posttranslacijski modificirati na velikom broju aminokiselina, što ima utjecaj na strukturu

kromatina i, samim time, na transkripciju gena [32]. Postoji nekoliko vrsta posttranslacijskih modifikacija kojima se histoni mogu obilježiti: acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, SUMOilacija, ADP-ribozilacija, deiminacija, proteolitičko kidanje N-terminalnog lanca histona i druge modifikacije. Od nabrojanih modifikacija, najbolje su istražene acetilacija i metilacija.

1.1.2.1. Acetilacija histona

Histoni se mogu acetilirati na bočnom ogranku aminokiseline lizin, što za posljedicu ima neutraliziranje pozitivnog naboja ove aminokiseline. Zbog toga slabi elektrostatična veza između histona i molekule DNA, što utječe na strukturu kromatina [33]. Acetilacija lizina također onemogućuje postavljanje drugih posttranslacijskih modifikacija na taj lizin. Jedan od primjera je acetilacija lizina na položaju 9 u histonu H3 (H3K9) koja sprečava njegovu metilaciju i uspostavu transkripcijski represivne oznake. Još jedna uloga acetilacije lizina je stvaranje veznih mjesta za druge proteine koji sadrže bromodomenu/e, domene proteina koje specifično prepoznaju acetilirane lizine. Brojni proteini koji sadrže ovu domenu imaju ulogu u aktivaciji transkripcije gena [34, 35]. Na primjer, kompleks proteina SWI/SNF (od engl. *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*), koji može, uz utrošak ATP, remodelirati strukturu kromatina [36].

Postavljanje ove oznake kataliziraju enzimi histon acetiltransferaze, koji se dijele u dvije skupine, tip A i tip B. Enzimi tipa B mogu acetilirati samo histone koji nisu vezani u nukleosome. Ovi enzimi smješteni su u citoplazmi, u kojoj acetiliraju novosintetizirane histone na nekoliko lizina. Pretpostavlja se da ova acetilacija utječe na ugradnju novosintetiziranih histona u nukleosome, nakon čega se acetilne skupine uklanjaju [37]. Histon acetiltransferaze tipa A mogu acetilirati histone u nukleosomu. Ovi proteini većinom su dio kompleksa proteina koji djeluju kao aktivatori transkripcije. Protein TAF(II)250 (od engl. *TBP-associated Factor 250 kDa (p250)*), koji je dio kompleksa TFIID, sastavnog dijela transkripcijske mašinerije, je histon acetiltransferaza [38]. Protein CBP (od engl. *CREB-binding protein*), poznati aktivator transkripcije gena ima histon acetiltransferaznu aktivnost, kao i njemu srodan protein, p300 [39].

Uklanjanje acetilne skupine kataliziraju enzimi histon deacetilaze. U čovjeka je za sada poznato 18 histon deacetilaza, koje se razvrstavaju u četiri klase. Velik broj ovih enzima otežava precizno definiranje njihovih specifičnih ciljnih supstrata, s obzirom na to da nedostatak aktivnosti jednog enzima može biti nadomješten aktivnošću drugih enzima. Također, pojedini enzimi mogu biti dio nekoliko različitih kompleksa proteina koji imaju različite uloge u stanicama [40].

Uklanjanje acetilne skupine s bočnog ogranka lizina pridonosi promjeni strukture kromatina što dovodi do smanjenog ispoljavanja gena. Deacetilacija, logično, dovodi do poništavanja učinaka acetilacije. Ponovno uspostavljanje pozitivnog naboja na lizinu jača elektrostatične veze između histona i molekule DNA. Deacetilirani lizini mogu se modificirati i drugim posttranslacijskim modifikacijama koje mogu pridonjeti utišavanju gena. Dobar primjer je metilacija lizina 9 i 27 u histonu H3. Uklanjanje acetilne skupine također uklanja vezna mjesta za proteine koji sadrže bromodomene, od kojih brojni, kao što je prije navedeno, djeluju kao aktivatori transkripcije [34, 41].

1.1.2.3. Metilacija histona

U histonu se mogu metilirati dvije aminokiseline: lizin i arginin, u nekoliko koraka. Lizin se može mono-, di- i tri metilirati, dok se arginin može monometilirati te dimetilirati; simetrično ili asimetrično [42]. Metilacija lizina bolje je istražena u odnosu na metilaciju arginina. Metilacija, za razliku od acetilacije, ne mijenja naboj molekule, ali stvara vezna mjesta za druge proteine koji, u konačnici, utječu na strukturu kromatina [43]. Nekoliko je domena proteina koje prepoznaju metilirane histone i omogućuju vezanje. Od posebnog značaja je Tudor superobitelj domena proteina koju čine: domena Tudor, kromodomene, domena PWWP i domena MBT [43, 44].

Metilaciju lizina kataliziraju enzimi histon lizin metiltransferaze. Za sada su poznate dvije obitelji ovih enzima; enzimi koji sadrže domenu SET te proteini nalik proteinu DOT1 (od engl. *Disruptor of Telomeric Silencing 1*). Ovi enzimi kataliziraju prijenos metilne skupine s kofaktora S-adenozil-L-metionina na bočni ogranak lizina [45, 46]. Uklanjanje metilnih skupina kataliziraju histon lizin demetilaze. Slično histon lizin metiltransferazama, ovi su enzimi podijeljeni u dvije obitelji. Enzimi obitelji LSD (od engl. *Lysine Specific Demethylase*), nazvane prema prvoj otkrivenoj histon lizin demetilazi, LSD1, [47] oksidiraju amin na bočnom ogranku lizina čime se uklanja metilna skupina i oslobađa formaldehid. Kao kofaktor se u ovoj reakciji koristi flavin adenin dinukleotid, FAD. Enzimi ove obitelji mogu demetilirati samo mono- i dimetilirane lizine [48]. Drugu obitelj čine enzimi koji imaju domenu Jumonji C. Enzimi ove obitelji mogu ukloniti metilne skupine s lizina neovisno o stupnju metilacije, a u reakcijama koriste kofaktore: α -ketoglutarat i Fe²⁺ [49].

Uloga metilacije u regulacije transkripcije ovisi o položaju lizina u histonu. Na primjer, trimetilacija lizina 4 u histonu H3 snažno je povezana s transkripcijski aktivnim kromatinom [50]. S druge strane, trimetilacija lizina 9 u histonu H3 prisutna je u konstitutivnom i fakultativnom heterokromatinu i ima ulogu u inaktivaciji kromosoma X u sisavaca [51].

1.1.2.4. Metilacija H3K27

U stanicama eukariota molekula DNA veže se s proteinima, histonima, i tvori nukleosome. Jezgra nukleosoma sastoji se od osam proteina histona, po dvije molekule histona H2A, H2B, H3 i H4. N-terminalni dijelovi histona "izviru" iz nukleosoma i mogu biti postranslacijski modificirani na brojnim aminokiselinama što utječe na strukturu samog nukleosoma i okolnog kromatina [52, 53, 54].

Jedna od posttranslacijskih modifikacija histona H3 je metilacija lizina 27 (H3K27). Ovu reakciju katalizira enzim EZH2 (od engl. *Enhancer of Zeste Homolog 2*), koji je podjedinica kompleksa proteina PRC2 (od engl. *Polycomb Repressive Complex 2*), koji može mono-, di- i trimetilirati H3K27. Postojanje više razina metilacije H3K27 moguće je zbog toga što se afinitet EZH2 u odnosu na lizin 27 smanjuje s većim stupnjem metilacije. EZH2 je najučinkovitiji u mono- i dimetilaciji H3K27, dok je manje učinkovit u uspostavljanju oznake H3K27me3 [55, 56].

Trimetilacija H3K27 povezana je s utišavanjem gena. Ovu oznaku prepoznaje drugi kompleks proteina, PRC1 (od engl. *Polycomb Repressive Complex 1*) koji potom monoubikvitinira lizin 119 u histonu H2A, što za posljedicu ima kondenziranje kromatina; nastaje heterokromatin [57, 58]. Trimetilacija H3K27 nužna je za pravilnu diferencijaciju stanica te održavanje pluripotentnosti matičnih stanica [59, 60, 61]. Nepravilno postavljanje ili uklanjanje oznake H3K27me3 ima važnu ulogu u nastanku i napredovanju novotvorina [62].

U nekim je stanicama metilacija H3K27 izrazito učestala. Na primjer, analize koje su proveli Ferrari i suradnici pokazale su da je u embrionalnim stanicama miša približno 80% histona H3 metilirano na lizinu 27. Od toga, 70% je dimetilirano (H3K27me2). Preostalih 30% čini monoi trimetilirani H3K27 [63]. Oznaka H3K27me1 pronađena je u genima koji se aktivno prepisuju, dok je H3K27me3 obogaćen u području otoka CpG utišanih gena [64].

Budući da trimetilacija H3K27 ima važnu ulogu u regulaciji ispoljavanja gena, osim postavljanja ove oznake, nužno je postojanje mehanizama kojima se ona može i ukloniti. Uklanjanje oznake ovisi o dvije lizin specifične demetilaze: 6A i 6B (KDM6A i KDM6B) [65].

Svaki od spomenutih enzima, kao i njihove uloge u fiziološkim uvjetima i onkogenezi, bit će raspravljeni u narednim poglavljima.

1.1.2.5. Histon lizin metiltransferaza EZH2

Protein EZH2 je histon lizin metiltransferaza koja katalizira prijenos metilne skupine sa Sadenozil-L-metionina na lizin 27 u histonu H3. Kao što je ranije rečeno, EZH2 može mono-, di- i trimetilirati H3K27, s time da afinitet enzima negativno korelira sa stupnjem metilacije [55]. EZH2 ovu funkciju obnaša kao podjedinica kompleksa proteina PRC2, koji se sastoji od nekoliko različitih podjedinica. Podjedinice EED (od engl. *Embryonic Ectoderm Development Protein*) i SUZ12 (od engl. *Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog*) neophodne su za aktivnost EZH2 *in vitro* [66, 67]. Ostale podjedinice, RbAp46/48 (od engl. *Retinoblastoma-Associated Proteins p46/p48*), JARID2 (od engl. *Jumonji/ARID Domain-Containing Protein* 2), AEBP2 (od engl. *Adipocyte Enhancer-Binding Protein* 2) i proteini PCL (od engl. *Polycomb-like Proteins*) određuju aktivnost EZH2 i ciljna mjesta metilacije histona H3 u kromatinu [62, 68]. Stanice sisavaca posjeduju i paralog, *EZH1* (od engl. *Enhancer of Zeste Homolog 1*), koji katalizira istu reakciju metilacije kao i EZH2 [69], ali je manje aktivan u odnosu na EZH2. Ova dva enzima također imaju drugačiji profil ispoljavanja u tkivima. EZH1 je konstitutivno ispoljen u većini tkiva, dok je EZH2 ispoljen u stanicama koje proliferiraju [70].

Gen *EZH2* zauzima 77 kilobaza na dugačkom kraku sedmog kromosoma (7q36.1). Prema podatcima dostupnim u bazi podataka NCBI (od engl. *National Center for Biotechnology Information*), alternativnim prekrajanjem primarnog transkripta EZH2 nastaje pet eksperimentalno potvrđenih transkripcijskih inačica. Prema bazi podataka UniProt, "kanonska" inačica proteina EZH2 sastoji se od 746 aminokiselina. Protein EZH2 sadrži nekoliko domena nužnih za funkcioniranje enzima koje su prikazane na Slici 1. Preko domena "EED", "1" i "2" EZH2 stupa u interakciju s drugim proteinima kompleksa PRC2 [71]. Na C-terminalnom dijelu proteina nalazi se domena SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax). Sastoji se od 116 aminokiselina i katalitička je domena sET prisutna je i u drugim metiltransferazama. EZH2 posjeduje i područje CXC, koje je bogato aminokiselinom cistein. Ovo područje, nužno za aktivnost enzima, nije prisutno u ostalim metiltransferaza [72, 73].



Slika 1. Struktura proteina EZH2. EED – domena za interakciju s EED; 1 – domena 1 (interakcija s PCL1); 2 – domena 2 (interakcija sa SUZ12); CXC – područje bogato cisteinima; SET – katalitička domena enzima.

Proteini grupe Polycomb otkriveni su u organizmu *Drosophila melanogaster*, u kojem, zajedno s proteinima skupine Trithorax, kontroliraju ispoljavanje gena skupine HOX, koji su ključni za pravilan razvoj vinske mušice [74]. Homolozi proteina grupe Polycomb otkriveni su i u drugim organizmima, uključujući i sisavce [75].

Kao što je prethodno spomenuto, EZH2 i PRC2 imaju ključnu ulogu u kontroli pravilne diferencijacije stanica i održavanju pluripotentnosti matičnih stanica [59, 60, 61, 76, 77]. Kompleks PRC2 sudjeluje u nasumičnoj inaktivaciji jednog od X kromosoma u stanicama ženki sisavaca [78, 79]. Vire i suradnici su pokazali da EZH2, u sklopu PRC2, stupa u interakciju sa sve tri DNA metiltransferaze (DNMT1, DNMT3a i DNMT3b) i potiče njihovo vezanje na istovjetno, ciljno mjesto na molekuli DNA. Autori su na primjeru gena *MYT1* (od engl. *Myelin Transcription Factor 1*) pokazali da su za utišavanje MYT1 potrebni i EZH2, i DNA metiltransferaze [80]. Analiza posrednog vezanja PRC2 za DNA u embrionalnim fibroblastima čovjeka pokazala je da se PRC2 veže u području više od 1000 gena, od kojih su brojni važni za razvoj embrija [81].

Najbolji dokaz o vitalnoj važnosti EZH2 i PRC2 povezan je s istraživanjima kojima je pokazano da "knock-out" ključnih komponenti kompleksa PRC2: Suz12, Eed i Ezh2, u miševa nije spojiv sa životom [66, 82, 83].

1.1.2.6. Histon lizin demetilaza KDM6A

Histon lizin demetilaza KDM6A (od engl. *Lysine Specific Demethylase 6A*), poznata i pod nazivom UTX (od engl. *Ubiquitously-Transcribed TPR Protein on the X Chromosome*), katalizira demetilaciju H3K27me3. Dio je obitelji proteina KDM6, zajedno s proteinima KDM6B (sinonim: JMJD3) i KDM6C (sinonim: UTY).

Gen *KDM6A* zauzima 240 kilobaza na kratkom kraku kromosoma X (Xp11.3). Prema bazi podataka NCBI, prekrajanjem primarnog transkripta nastaje šest eksperimentalno potvrđenih

transkripcijskih inačica. U bazi podataka UniProt navedena je jedna potvrđena izoforma proteina koja sadrži 1401 aminokiselinu, molekularne mase 154 kDa. Kodirana je transkripcijskom inačicom 3 (NM_021140.4), koja se sastoji od 29 eksona. Baza podataka UniProt navodi i 19 potencijalnih, eksperimentalno nepotvrđenih, inačica proteina. Gen *KDM6C* je paralog gena *KDM6A*. Smješten na kromosomu Y i kodira protein UTY koji, u ljudi, pokazuje visoki stupanj sličnosti (83%) primarne strukture s proteinom KDM6A [84]. Gen *KDM6A* prepisuje se u stanicama ženki miša, ali i čovjeka, s inaktiviranog kromosomaX [85].

Protein KDM6A u C-terminalnom dijelu posjeduje domenu Jumonji C (JmjC) koja je nužna za katalitičku aktivnost enzima [65]. Ova domena sadrži vezna mjesta za kofaktore: ione Fe²⁺ i α-ketoglutarat te određuje specifičnost enzima u odnosu na supstrat. KDM6A demetilira isključivo metilirani H3K27, ali ne i druge metilirane lizine u histonu H3; na primjer lizin 9 ili lizin 36 [86]. Iako KDM6A može ukloniti više metilnih skupina s H3K27me3, najveći afinitet ima upravo prema H3K27me3. Afinitet prema supstratu opada sa stupnjem metilacije (H3K27me3>me2>me1) [87]. Protein KDM6A također sadrži šest domena TPR (od engl. Tetratricopeptide Repeat) koje su nužne za interakciju s drugim proteinima [88, 89]. Od posebnog značaja su interakcije s proteinima koji mogu posttranslacijski modificirati histone, ili remodelirati kromatin. Protein KDM6A može stupiti u interakciju s kompleksom proteina MLL4 (od engl. Myeloid/lymphoid or Mixed-lineage Leukemia Protein 4) koji katalizira metilaciju lizina na položaju 4 u histonu H3 (H3K4); ova posttranslacijska modifikacija povezana je s aktivnom transkripcijom [90]. Tie i suradnici pokazali su da se KDM6A veže s acetiltransferazom CBP (od engl. CREB-binding protein) koja acetilira H3K27 i antagonist je kompleksu proteina PRC2 [91]. KDM6A stupa u interakciju i s kompleksom proteina SWI/SNF, koji može remodelirati strukturu kromatina. Na ovaj način KDM6A, kao i srodni protein KDM6B, mogu posredno sudjelovati u remodeliranju kromatina [92].

Protein KDM6A konstitutivno je ispoljen u velikom broju tkiva [85], osobito tijekom razvoja organizma - nužan je za pravilno odvijanje embriogeneze. Lan i suradnici utišali su gen *KDM6A* u liniji stanica HeLa što je dovelo do povećanja razine H3K27me3 u području promotora pojedinih gena obitelji HOX, koji imaju ulogu u razvoju tijekom embriogeneze. Autori su potom napravili "knock-down" homologa gena *KDM6A* u oplođenim jajnim stanicama riba zebrica, te opazili abnormalnosti u razvoju stražnjeg dijela životinja. Unos divljeg tipa glasničke RNA UTX u oplođenu jajnu stanicu, dovodi do smanjenja razvojnih defekata [93]. Wang i suradnici napravili su velik broj pokusa na embrionalnim matičnim

stanicama podrijetlom od mužjaka miševa, kako bi istražili ulogu gena i proteina UTX i UTY. Pokazali su da ova dva gena nisu neophodna za održavanje pluripotentnosti, niti za započinjanje diferencijacije embrionalnih stanica. Međutim, protein UTX, neovisno o tome da li je katalitički aktivan ili neaktivan, nužan je za diferencijaciju mezoderma. Stanice u kojima je gen *UTX* inaktiviran "knock-out" ne ispoljavaju biljege mezoderma tijekom diferencijacije, i sukladno tome, mezoderm nastao iz ovih stanica je defektan. Pokusi na miševima pokazali su da je potpuni "knock-out" gena *UTX* (*UTX* ^{-/-}) u embrijima ženki smrtonosan tijekom embriogeneze, dok *UTX* ⁻ mužjaci preživljavaju embrionalni razvoj, ali umiru u vrijeme okota zbog defektata neuralne cijevi i nemogućnosti disanja [94].

Welstead i suradnici također su pokazali da je homozigotni "knock-out" gena *UTX* u ženki miša letalan u embrionalnom stadiju razvoja, ali za razliku od prije spomenutog rada, kojega su objavili Wang i suradnici [94], "knock-out" gena *UTX* u mužjacima nije uzrokovao smrt svih embrija. Iako je broj okoćenih mužjaka bio je manji od očekivanog, miševi su bili vijabilni te reproduktivno kompetentni [95]. Još jedna skupina znanstvenika pokazala je da *UTX* ^{-/-} ženke ugibaju tijekom embrionalnog razvoja, dok dio *UTX*⁻ mužjaka preživljava do odrasle dobi. Međutim, "knock-out" oba gena, *UTX* i *UTY*, u embrijima mužjaka nije spojiv s životom, što upućuje na to da je gen *UTY*, koji se nalazi na Y kromosomu, u stanju barem djelomično nadoknaditi gubitak gena *UTX*, u mužjaka [84].

1.1.2.7. Histon lizin demetilaza KDM6B

KDM6B (od engl. *Lysine Specific Demethylase 6B*), poznat i pod nazivom JMJD3 (od engl. *JmjC domain-containing protein 3*), je histon lizin demetilaza, koja katalizira demetilaciju H3K27me3.

Gen KDM6B zauzima 20,6 kilobaza na kratkom kraku 17. kromosoma (17p13.1). Prema podatcima u bazi podataka NCBI, postoje dvije eksperimentalno potvrđene transkripcijske inačice KDM6B, čijom translacijom nastaju dvije izoforme proteina. Prema bazi podataka UniProt, izoforma dva (#015054-2) koju kodira transkripcijska inačica dva (NM_001348716.2) smatra se kanonskom izoformom proteina koja se sastoji od 1643 aminokiseline. Transkripcijska inačica jedan (NM 001080424.2), u odnosu na inačicu dva, zadržava intron u 3' kodirajućoj regiji i njenom translacijom nastaje izoforma jedan (#O15054-1), koja se sastoji od 1682 aminokiselina. Kao i ostali članovi obitelji KDM6, protein KDM6B sadrži domenu Jumonji C koja je nužna za katalitičku aktivnost enzima. Iako postoji značajni stupanj homologije između proteina KDM6A i KDM6B, protein KDM6B ne sadrži domene TPR [65, 87].

Kao i enzim KDM6A, KDM6B neophodan je za embrionalni razvoj organizma. Protein Jmjd3 zajedno s proteinom Tbx3 (od engl. *T-box 3*) regulira ispoljavanje gena *Eomes* koji ima ključnu ulogu u diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica miša u stanice endoderma [96]. Pokusima na embrionalnim matičnim stanicama miševa pokazano je da "knock-out" gena *Jmjd3* uzrokuje poremećaj u diferencijaciji stanica u stanice mezoderma. Također, "knock-out" gena *Jmjd3* interferira s diferencijacijom embrionalnih matičnih stanica u stanice endotela i kardiomiocite. Daljnje analize pokazale su da "knock-out" *Jmjd3* rezultira smanjenim vezanjem RNA polimeraze II na gene koji imaju ključnu ulogu u diferencijaciji embrionalnih stanica u stanice mezoderma. Na promotorima dva gena *Brachyury* i *Mixl1* (od engl. *Mix1 Homeobox-like 1*) otkrivena je povećana razina H3K27me3 [97].

Ispoljavanje KDM6B potaknuto je upalnim procesima i onkogenima. U makrofazima miša, aktiviranim izlaganjem lipopolisaharidu (LPS) i interferonu gama, čimbenik transkripcije NFκB snažno potiče ispoljavanje *Jmjd3*. Kromatinskom imunoprecipitacijom pokazano je da se Jmjd3 veže na promotore gena uključenih na odgovor makrofaga na LPS te različitih kemokina, citokina i drugih molekula uključenih u upalni proces [98]. Satoh i suradnici pokazali su da je Jmjd3 nužan je za polarizaciju makrofaga u M2-makrofage, nakon izlaganja miševa polisaharidu hitinu. Također, *Jmjd3^{-/-}* makrofazi potaknuti s M-CSF (od engl. *Macrophage Colony Stimulating Factor*) imaju smanjenu proliferiraciju u odnosu na divlji tip makrofaga. Pokusima, u kojima su miševi bili inficirani parazitom *Nippostrongylus, brasiliensis* pokazano je da "knock-out" gena *Jmjd3* u makrofazima dovodi do smanjenjog ispoljavanja kemokina eotaxin-2 i interleukina 4 i 13, koji imaju ključnu ulogu u privlačenju eozinofila. Posljedica toga je značajno smanjen broj eozinofila na mjestu infekcije [99].

Infekcija CD19+ mononuklearnih B-stanica virusom Epstein-Barr (EBV) povećava razinu transkripta i proteina KMD6B. Pokazano je i da onkoprotein LMP1 (od engl. *Latent Membrane Protein 1*), koji može uzrokovati zloćudnu preobrazbu B-limfocita [100], potiče ispoljavanje *KDM6B*. Analizom diferencijalno ispoljenih gena u stanicama koje su prekomjerno ispoljavale KDM6B pokazano je da je veliki broj tih gena također ispoljen i u B-limfocitima zaraženim EBV, što upućuje na ulogu KDM6B u odgovoru stanica na EBV i njegovu potencijalnu ulogu u patogenezi limfoma, u patogenezi kojih EBV ima važnu ulogu [101].

1.2. Epigenetičke promjene u zloćudno preobraženoj stanici

Epigenetičke promjene mogu doprinijeti nastanku i napredovanju tumora. Brojni epigenetički procesi promijenjeni su u stanicama tumora, o čemu najbolje svjedoče brojne mutacije u proteinima koji uspostavljaju obrazac specifičnih epigenetičkih modifikacija [102]. Metilacija molekule DNA ima posebno važnu ulogu u onkogenezi. Još prije 40 godina primijećena je globalna hipometilacija genoma tumora [103]. Hipometilacija DNA pridonosi nastanku genomske nestabilnosti i preslagivanju kromosoma [104] te aktivaciji, inače utišanih, retrotranspozona [105]. Hipometilacija u području regulatornih područja molekule DNA također je povezana s ispoljavanjem upisanih gena, na primjer gena *IGF2* (od engl. *Insulin Like Growth Factor 2*) u raku debelog crijeva [106]. S druge strane, u tumorima je primijećena hipermetilacija promotora gena čiji su proteinski produkti negativni regulatori procesa zloćudne preobrazbe (tumor supresorski geni), što dovodi do njihovog smanjenog ispoljavanja te doprinosi nastanku i napredovanju tumora [107, 108].

Posttranslacijske modifikacije histona također mogu biti promijenjene u stanicama tumora. Gubitak acetilacije lizina 16 u histonu H4 (H4K16) otkriven je u određenim vrstama tumora [109]. Neke histon deacetilaze prekomjerno su ispoljene u stanicama raka prostate, dojke, debelog crijeva, želuca i drugih tumora [110, 111, 112, 113]. S druge strane, u nekim vrstama tumora otkrivena je smanjena razina histon deacetilaza; na primjer, u raku pluća nemalih stanica [114]. Povećano ispoljavanje histon deacetilaza može dovesti do utišavanja tumor supresorskih gena, na primjer, *CDKN1A* (od engl. *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*; poznatiji pod nazivom P21), *BAX* (od engl. *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*) te receptora za TGF-β1 (od engl. *Transforming Growth Factor Beta 1*) [115].

U tumorima postoji i aberantna metilacija lizina u histonima. Prekomjerna metilacija lizina 9 u histonu H3 (H3K9) povezana je s utišavanjem tumor supresorskih gena u stanicama raka mokraćnog mjehura [116]. Histon lizin metiltransferaza EZH2, često je mutirana ili prekomjerno ispoljena u određenim vrstama zloćudnih tumora, o čemu će biti riječi u sljedećim poglavljima. U stanicama raka prostate, histon lizin demetilaza LSD1 veže se s receptorom za androgene i potiče transkripciju ciljnih gena uklanjanjem transkripcijski represivne oznake, trimetilacije H3K9 (H3K9me3) [117]. Isti enzim je snažno ispoljen u stanicama neuroblastoma i povezan je sa smanjenom diferencijacijom stanica [118].

1.2.1. Osobitosti EZH2 u zloćudnim tumorima

EZH2 je prekomjerno ispoljen u zloćudnim tumorima dojke, prostate, endometrija, jajnika i melanoma. Njegovo prekomjerno ispoljavanje često je povezano sa slabije diferenciranim tumorima i/ili uznapredovalim stadijem bolesti [119, 120, 121, 122]. Bracken i suradnici pokazali su da je ispoljavanje EZH2 pod utjecajem signalnog puta pRB-E2F (od engl. *Retinoblastoma-Associated Protein - Transcription Factor E2F*) te da je EZH2 nužan za proliferaciju transformiranih i netransformiranih stanica čovjeka. Autori su pretpostavili da je EZH2 onkogen, s obzirom na to da ektopično ispoljavanje EZH2 omogućuje bržu proliferaciju stanica, a genski lokus na kojem se nalazi gen *EZH2* često je amplificiran u zloćudnim tumorima [123]. Kleer i suradnici pokazali su da prekomjerno ispoljavanje EZH2 u imortaliziranim epitelnim stanicama dojke potiče rast neovisan o sidrenju i invaziju stanica, a za ovaj učinak nužna je funkcionalna katalitička domena EZH2 [121].

Osim povišenih razina EZH2, dokazane su i njegove mutacije, u nekim zloćudnim tumorima. Morin i suradnici otkrili su da je mutacija tirozina na položaju 641 u katalitičkoj domeni EZH2 prisutna u značajnom postotku difuznih B-velikostaničnih (21,7%) i folikularnih limfoma (7,3%) [124]. Ova mutacija dovodi do promjene afiniteta enzima u odnosu na supstrat. Kao što je prije spomenuto, divlji tip EZH2 ima najveći afinitet prema nemetiliranom H3K27, dok se s povećanjem razine metilacije supstrata afinitet EZH2 smanjuje. Mutirani EZH2 ima značajno smanjeni afinitet prema nemetiliranom supstratu, dok je afinitet prema metiliranom H3K27 povećan [55]. Mutacija je monoalelna; jedan alel je mutiran, dok je drugi nepromijenjen (divlji tip alela). U ovakvom slučaju, divlji tip enzima metilira nemetilirani H3K27, potom mutirani enzim "dovršava" metiliranje konačnim nastankom H3K27me3. Posljedica je povećana razina oznake H3K27me3, u odnosu na stanice s dva nemutirana alela EZH2 [55, 125]. McCabe i suradnici otkrili su još jednu vrstu mutacija EZH2 u limfomu B-stanica; zamjenu alanina glicinom, na položaju 677. Ova mutacija također dovodi do povećane razine H3K27me3 u stanicama, s time da je afinitet mutiranog proteina EZH2 u ovom slučaju jednak za sve razine metilacije H3K27 [126].

Navedene mutacije i prekomjerno ispoljavanje EZH2 mogu dovesti do utišavanja tumor supresorskih gena. EZH2 može utišati gen koji kodira protein RAD51, uključen u popravak oštećenja molekule DNA. Zbog toga dolazi do povećane nestabilnosti kromosoma i nakupljanja mutacija od kojih neke mogu biti onkogene [127]. U imortaliziranim stanicama epitela prostate prekomjerno ispoljavanje EZH2 dovodi do smanjene razine tumor

supresorskog proteina, E-kadherina [128]. Proteini kompleksa Polycomb također sudjeluju u utišavanju lokusa *INK4A/ARF*, koji sadrži nekoliko tumor supresorskih gena [129]. Povećano ispoljavanje EZH2 povezano je sa smanjenom razinom tumor supresorskog proteina, inhibitora ciklin ovisne kinaze 1C (engl. *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1C*), u raku jajnika [122]. Protein EZH2 može negativno utjecati i na mikrookoliš tumora te na taj način poticati rast i razvoj tumora. Lu i suradnici istražili su ulogu EZH2 u angiogenezi tumora jajnika [130]. Otkrili su povećanu razinu EZH2 u stanicama endotela u tumorima u usporedbi sa stanicama endotela zdravog tkiva. Daljnji pokusi, na stanicama endotela izdvojenih iz jajnika miševa, pokazali su da je ispoljavanje *Ezh2* potaknuto vaskularnim endotelnim čimbenikom rasta (VEGF, od engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), preko signalnog puta E2F. Povećana razina EZH2 uzrokuje metiliranje promotora gena *Vash1* (od engl. *Vasohibin 1*), snažnog supresora angiogeneze, zbog čega se smanjuje njegovo ispoljavanje, čime se potiče angiogeneza [130].

Onkogene uloge proteina EZH2 mogu biti i neovisne o kompleksu PRC2. Iznenađujuće, u tim slučajevima EZH2 potiče transkripciju gena. Shi i suradnici pokazali su da u stanicama karcinoma dojke, MCF-7, EZH2 stupa u interakciju s receptorom za estrogen alfa (ER α) i β -kateninom. Ova interakcija, koja je neovisna o metiltransferaznoj aktivnosti EZH2, dovodi do povećane transkripcije gena koji kodiraju proteine c-MYC i ciklin D1, što za posljedicu ima poticanje proliferacije stanica raka [131].

Lee i suradnici pokazali su, koristeći ER-negativne, "*basal like*" stanice raka dojke, da se EZH2 veže s proteinima - članovima obitelji NF-κB (od engl. *Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells*) i potiče transkripciju ciljnih gena: *IL-6* (od engl. *Interleukin-6*) i *TNF* (od engl. *Tumor Necrosis Factor*), koji imaju važnu ulogu u razvoju ove vrste raka. Niti u ovom slučaju, aktivacija transkripcije gena ne ovisi o metiltransferaznoj aktivnosti EZH2 [132]. Xu i suradnici pokazali su da u stanicama raka prostate otpornog na kastraciju fosforilacija EZH2 na serinu 21 potiče vezanje EZH2 s receptorom za androgene. Nastali kompleks proteina potiče transkripciju gena koji su uključeni u napredovanje ove vrste raka [133]. Mutacija EZH2 S21D, koja u funkciji oponaša fosforilaciju, omogućuje stanicama raka prostate ovisne o androgenima da rastu neovisno o njima. Za razliku od prethodno opisanih aktivnosti EZH2, neovisnih o PRC2 u stanicama raka, aktivacija transkripcije gena u stanicama raka prostate ovisi o metiltransferaznoj aktivnosti EZH2.

U populaciji matičnih stanica glioblastoma, fosforilacija EZH2 na serinu 21 potiče vezanje EZH2 na STAT3 (od engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), dovodi do metilacije STAT3 i aktivacije nizvodnog signalnog puta. Aktivacija ovog signalnog puta ima važnu ulogu u razvoju i progresiji glioblastoma [134]. Pokusi na imunokompromitiranim golim miševima pokazali su da utišavanje ili farmakološka inhibicija EZH2 smanjuje rast ksenograft-tumora, smanjuje razinu metilacije i fosforilacije STAT3 te za krajnju posljedicu ima smanjenu aktivnost signalnog puta STAT3 [135].

Osim onkogenih funkcija EZH2, zapažene su mutacije koje dovođe do gubitka funkcije proteina, što, u konkretnim modelima, upućuje na potencijalnu tumor supresivnu ulogu EZH2. Analizom 219 uzoraka mijelodisplastičnih/mijeloproliferativnih neoplazmi otkrivene su mutacije koje su dovele do gubitka funkcije EZH2 u 27 uzoraka (12%) [136]. Nikoloski i suradnici analizirali su DNA 126 bolesnika oboljelih od mijelodisplatičnih neoplazmi i u 23% otkrili delecije ili točkaste mutacije gena *EZH2* koje uzrokuju gubitak funkcije proteina [137]. Wang i suradnici analizirali su promjene gena *EZH2* u 230 uzoraka adenokarcinoma pluća. U najvećem postotku uzoraka (42%) bile su prisutne aktivirajuće mutacije ili amplifikacija gena *EZH2*. Međutim, u manjem dijelu uzoraka (14%) uočene su inaktivirajuće mutacije ili delecije *EZH2*. Daljnjim pokusima na miševima koji imaju konstitutivno aktivan protein Kras (Kras ^{G12D/+}) pokazano je da "knock-out" *Ezh2* značajno povećava učestalost pojave tumora u miševa i drastično smanjuje životni vijek miševa u odnosu na miševe koji imaju samo mutirani *Kras*. Ovo upućuje na to da bi u adenokarcinomu pluća koji ima aktivirajuću mutaciju *Kras* ^{G12D/+} Ezh2 mogao imati tumor supresivnu ulogu [138].

1.2.2. Osobitosti KDM6A u zloćudnim tumorima

U najvećem broju objavljenih znanstvenih publikacija, KDM6A ima tumorsupresorsku ulogu. Postoje i podatci koji upućuju na onkogenu ulogu KDM6A u specifičnim vrstama raka. Van Haaften i suradnici analizirali su 1390 uzoraka zloćudnih tumora i otkrili inaktivirajuće mutacije gena *UTX* u 39 uzoraka. Najveća učestalost mutacija *UTX* uočena je u uzorcima multiplog mijeloma (6/58, 10%), raku jednjaka pločastih stanica (6/77, 8%) i karcinomu bubrega (6/419, 1,4%) [139]. Analizom 3281 uzorka (12 različitih vrsta zloćudnih tumora) otkriven je visok stupanj mutacija *KDM6A* u urotelijanom tipu karcinoma mokraćnog mjehura (26,5%) [140]. U ovoj vrsti raka, mutacije koje dovode do gubitka funkcije KDM6A rezultiraju povećanom razinom H3K27me3 i represijom transkripcije određenih gena. Također, linija stanica podrijetlom od zloćudno promijenjenih uroelijalnih stanica koje imaju mutirani

KDM6A osjetljive su na utišavanje EZH2 u odnosu na stanice istog podrijetla, koje imaju divlji tip *KDM6A* [141].

Pokusima na genetski modificiranim miševima koji su imali aktivirajuću mutaciju u protoonkogenu *Kras* (*Kras* $^{G12D/+}$) pokazano je da "knock-out" gena *Utx* značajno povećava broj tumora pluća, veličinu tumora i smanjuje medijan preživljenja miševa u odnosu na miševe *Kras* $^{G12D/+}$ *Utx*^{+/+} (17, odnosno 30 tjedana). Daljnjim molekularnim analizama utvrđeno je da "knock-out" Utx dovodi do povećane razine proteina Ezh2 i posttranslacijske modifikacije H3K27me3 te smanjene razine mRNA tumor supresorskih gena *Cdkn2a* i *Cdkn2b* [142].

Watanabe i suradnici su metodom imunohistokemije analizirali 103 uzorka duktalnog adenokarcinoma gušterače čovjeka. U 26 uzoraka (26/103) KDM6A nije bio ispoljen, a njegovo neispoljavanje bilo je povezano s kraćim preživljenjem (OS, od engl. *Overal Survival*) (p=0,001). Pokusima na liniji stanica duktalnog adenokarcinoma gušterače BxPC3 pokazano je da "knock-out" *KDM6A* uzrokuje brži rast tumora u odnosu na divlji tip stanica BxPC3, nakon usadnje u miševe NOD-SCID (od engl. *Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*) [143].

Zheng i suradnici su na miševima pokazali da "knock-out" gena Utx uzrokuje mijeloproliferativne/mijelodisplatične sindrome, slične kroničnoj mijelomonocitnoj leukemiji. Istovremeni, dvostruki "knock-out" gena Utx i Tp53 rezultirao je razvojem istog poremećaja i drastično kraćim preživljenjem životinja (7/12 $Utx^{-/-}$ miševa je poživjelo do 25 mjeseci, $UTX^{-/-}$ i $Tp53^{-/-}$ miševi su imali medijan preživljenja 3,8 mjeseci). Analizom koštane srži miševa $Utx^{-/-}$ opažen je povećan broj hematopoetskih matičnih stanica koje su imale izraženiju sposobnost samoobnove u usporedbi sa stanicama dobivenim iz koštane srži miševa divljeg tipa [144].

Ezponda i suradnici pokazali su, velikim brojem pokusa na linijama stanica podrijetlom od multiplog mijeloma, da gubitak gena *UTX* potiče proliferaciju i adheziju stanica raka u odnosu na divlji tip stanica. Ponovno ispoljavanje *UTX* u stanicama dovelo je do smanjene proliferacije stanica, ali ne i njihove smrti. Rezultati dobiveni *in vitro* potvrđeni su na miševima NOD-SCID *in vivo:* stanice multiplog mijeloma ARD koje su imale inducibilni *UTX* sustav usađene su pod kožu. Ponovno poticanje ispoljavanja *UTX* dovelo je do smanjene mase tumora i proliferacije stanica [145].

Analizom 35 uzoraka akutne limfoblastične lekemije T-stanica (T-ALL), Van der Meulen i suradnici otkrili su mutacije koje su dovele do gubitka funkcije gena *UTX* u pet uzoraka (14,3%), u muškaraca (25/35). Pokusima *in vivo*, na modelu T-ALL u miša, s potaknutim

prekomjernim ispoljavanjem gena Notch1 (od engl. Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1) pokazano je da utišavanje gena Utx, uz prekomjerno ispoljavanje Notch1, ubrzava nastajanje T-ALL u odnosu na samo prekomjerno ispoljen Notch1 (29 dana u odnosu na 54 dana). Analizom transkriptoma stanica T-ALL potaknutih utišavanjem Utx otkriveno je smanjeno ispoljavanje tumor supresorskih gena Ect2l (od engl. Epithelial Cell Transforming Sequence 2 Oncogene-like) i Nf1 (od engl. Neurofibromin 1) te povećano ispoljavanje onkogena Tal1 (od engl. T Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1). Dodatno, kromatinskom imunoprecipitacijom pokazana je povećana razina oznake H3K27me3 na promotorima nekoliko potencijalnih tumor supresorskih gena [146].

Postoje i publikacije koje upućuju na postojanje onkogenih funkcija proteina KDM6A. Eksperimentima koje su proveli Xie i suradnici na stanicama raka dojke MCF-7, koje su pozitivne na estrogeni receptor, pokazano je da KDM6A stupa u interakciju s receptorom za estrogen α (ER α), naročito u prisutnosti 17 β -estradiola. Kromatinskom imunoprecipitacijom je dokazano da se UTX i ER α vežu na regulatorni element *cis*, koji utječe na ispoljavanje koreceptora za kemokin *CXCR4* (od engl. *Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4*), koji ima važnu ulogu u proliferaciji i preživljenju stanica raka dojke te metastaziranju. Sukladno tome, inaktiviranje *UTX* ("knock-out") bilo je povezano sa smanjenom proliferacijom i migracijom stanica MCF-7. Metodom imunohistokemije, na 104 uzorka raka dojke, pokazana je pozitivna korelacija između razine proteina UTX i CXCR4 u ER+ pozitivnim uzorcima (r= 0,45; p=0,006). Također, povećana razina UTX povezana je s lošijim sveukupnim preživljenjem bolesnica s rakom dojke pozitivnim na estrogeni receptor (logrank p=0,019) [147].

Iako prethodno navedena publikacija Van der Meulena i suradnika upućuje na tumor supresivnu ulogu gena *UTX* u T-ALL [146], rezultati pokusa koje su proveli Benyoucef i suradnici ukazali su na onkogena svojstva gena *UTX* u podskupini T-ALL koju karakterizira ispoljavanje onkogenog čimbenika transkripcije, TAL1. Autori su pokazali da UTX i TAL1 stupaju u interakciju, vežu se na promotore gena uključenih u proliferaciju stanica i inhibiciju apoptoze te potiču njihovu transkripciju. Smanjena razina proteina UTX dovela je do povećane razine oznake H3K27me3 na promotorima tih gena i njihovim smanjenim ispoljavanjem. Utišavanje gena *UTX* u TAL1-pozitivnoj skupini T-ALL dovelo je do smanjene proliferacije i povećane stope apoptoze stanica. Istovjetno utišavanje nije imalo značajan učinak na stanice T-ALL koje ne ispoljavaju TAL1. S druge strane, prekomjerno ispoljavanje UTX potaknulo je proliferaciju stanica T-ALL pozitivnih na TAL1. U stanicama negativnim na TAL1, prekomjerno ispoljavanje imalo je suprotan učinak – smanjenju stopu proliferacije. U obje vrste

stanica T-ALL opaženi učinak ovisio je o katalitičkoj aktivnosti enzima [148]. Navedeni rezultati upućuju na stanično-specifičan, i o molekularno-genetičkoj podlozi ovisan, učinak KDM6A.

1.2.3. Osobitosti KDM6B u zloćudnim tumorima

U većini do sada objavljenih istraživanja pokazano je da KDM6B ima onkogenu ulogu. Međutim, kao i kod EZH2, postoje dokazi da u određenim vrstama tumora KDM6B ima tumor supresivnu ulogu. Ovdje su navedni neki od primjera uloge koju KDM6B ima u različitim tumorima.

Park i suradnici prekomjerno su ispoljili divlji tip i katalitički neaktivan JMJD3 u stanicama melanoma A375-LM3 i MeWo-LM2. Prekomjerno ispoljavanje nije imalo učinak na proliferaciju stanica i stanični ciklus *in vitro*. Međutim, usađivanje stanica koje su prekomjerno ispoljavale divlji tip enzima pod kožu imunokompromitiranih miševa za posljedicu je imalo brži rast melanoma. Ovaj fenomen izostao je kada je isti eksperiment napravljen sa stanicama koje nisu prekomjerno ispoljavale JMJD3, ili su ispoljavale katalitički neaktivan enzim. Dodatnim pokusima utvrđeno je da JMJD3 potiče angiogenezu i infiltraciju makrofaga u melanom, aktiviranjem signalnog puta BMP (od engl. *Bone Morphogenetic Protein*) [149].

Ispoljavanje proteina KDM6B povećano je u nekim virusnim infekcijama koje su protumorigenične, na primjer infekcija papilomavirusom čovjeka (HPV). McLaughlin-Drubin i suradnici pokazali su da onkoprotein E7 u stanicama keratinocita izdvojenih iz prepucija povećava razinu transkripta i proteina KDM6A i KDM6B. Povećana razina KDM6B rezultirala je smanjenom razinom oznake H3K27me3 u području promotora tumor supresorskog gena *P16INK4A*, dobro poznatog biljega za tumore povezane s HPV. Osim ovog gena, smanjena razina H3K27me3 primijećena je na promotorima nekoliko gena iz obitelji *HOX*, važnih regulatora embriogeneze. Utišavanje KDM6A i KDM6B u stanicama raka vrata maternice pozitivnih na HPV tip 16 (linija stanica Ca Ski) dovodi do smanjene sposobnosti stvaranja kolonija *in vitro*, što upućuje na moguću ulogu koju ova dva enzima imaju u procesu onkogeneze, vezane uz infekciju HPV [150].

Ohguchi i suradnici otkrili su da je ispoljavanje KDM6B povećano u uzorcima multiplog mijeloma u usporedbi s plazma stanicama. Utišavanje ili "knock-out" *KDM6B* smanjili su proliferaciju te potaknuli apoptozu u linijama stanica multiplog mijeloma, dok je prekomjerno ispoljavanje *KDM6B* potaknulo njihovu proliferaciju. Daljnjim pokusima autori su pokazali da

je ispoljavanje gena *KDM6B*, ali ne i *KDM6A*, pod utjecajem signalnog puta NF-κB. Inhibicija ovog signalnog puta spojem MLN120B smanjila je proliferaciju stanica multiplog mijeloma MM.1S, dok je istovremeno prekomjerno ispoljavanje KDM6B imalo suprotan učinak. Analizom stanica MM.1S *KDM6B*^{-/-} pronađena je smanjena razina transkripta i proteina ELK1 (od engl. *ETS Transcription Factor ELK1*) i FOS (od engl. *Fos Proto-oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit*). Ovi proteini uključeni su u signalni put protein-kinaza potaknutih mitogenom (MAPK; od engl. *Mitogen-activated Protein Kinase*), koji je važan za proliferaciju i preživljenje stanica multiplog mijeloma [151].

Posebno zanimljiva je studija koju su objavili Ntziachristos i suradnici, kojom su otkrili da KDM6A i KDM6B, iako kataliziraju istu reakciju, imaju suprotne uloge u T-ALL. Na modelu T-ALL potaknute prekomjernim ispoljavanjem Notch1 u miševa, autori su pokazali da je u stanicama raka povećana razina mRNA i proteina Jmjd3, dok Utx i Ezh2 nisu promijenjeni, u odnosu na kontrolne T-stanice [152]. Povećano ispoljavanje Jmjd3 posljedica je aktivacije signalnog puta NF-κB, što je u skladu s rezultatima objavljenim u prethodno navedenim publikacijama [151]. Analizom nativnih uzorka T-ALL pokazano je da je JMJD3 povećano ispoljen u ovoj vrsti raka; i u odnosu na druge leukemije, i u odnosu na normalne preteče Tstanica. Pokusima kromatinske imunoprecipitacije pokazano je da se u liniji stanica T-ALL, CUTLL1 (stanice humanog podrijetla), protein JMJD3 veže na promotore gena (HEY1, NRARP, HESI) koji su pod utjecajem proteina NOTCH1 i čiji proteinski produkti imaju onkogene funkcije. Utišavanje JMJD3 dovelo je do povećanja razine oznake H3K27me3 na promotorima gena, i samim time njihovog smanjenog ispoljavanja. Također, utišavanje JMJD3 smanjilo je vijabilnost stanica. Međutim, utišavanje gena UTX uzrokovalo je njihovu povećanu proliferaciju nakon usadnje u imunokompromitirane miševe. Ovo ukazuje da gen UTX može imati tumorsupresorsku ulogu u T-ALL [146]. Dodatno, sekvenciranjem gena UTX u uzorcima T-ALL u djece otkrivene su različite mutacije koje dovode do gubitka funkcije UTX, što dodatno upućuje na njegovu tumor supresorsku ulogu, u ovoj vrsti zloćudne bolesti [152].

Osim onkogenih uloga u nekim vrstama zloćudne bolesti, postoje i dokazi o tumor supresorskoj ulozi KDM6B. Pokusima na stanicama podrijetlom od duktalnog adenokarcinoma gušterače (linije stanica BxPC3 i SU.86.86) pokazano je da "knock-down" *KDM6B* potiče njiihovu diseminaciju nakon ortotopijske implantacije u imunokompromitirane gole miševe. Pokusima *in vitro,* s istim stanicama, pokazano je da smanjeno ispoljavanje *KDM6B* potiče rast stanica neovisan o sidrenju i stvaranje sfera. Pokazano je, također, da KDM6B regulira transkripciju

poznatog tumor supresorskog gena, CEBPA (od engl. CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha) [153].

Yang i suradnici su pokusima na linijama stanica podrijetlom od neuroblastoma miša otkrili da je ispoljavanje *Kdm6b* smanjeno u matičnim stanicama, u odnosu na stanice raka koje su pokazale veći stupanj diferencijacije. Analizom uzoraka neuroblastoma dvije neovisne skupine bolesnika otkrivena je povezanost smanjene razine mRNA *KDM6B* s kraćim preživljenjen, vezano uz osnovnu bolest ($p= 2,3x10^{-12}$ i p= 0,0034). Prekomjerno ispoljavanje *KDM6B* inhibiralo je proliferaciju stanica neuroblastoma *in vitro* te smanjilo njihov tumorigenični potencijal *in vivo*, u imunokompromitiranim miševima. Ovaj učinak ovisio je o katalitičkoj aktivnosti enzima; ispoljavanje neaktivnog enzima nije imalo učinka na stanice. U skladu s ovim rezultatima, utišavanje *KDM6B* povećalo je proliferaciju stanica neuroblastoma. Utvrđeno je i da KDM6B potiče diferencijaciju stanica neuroblastoma: stvaraju se aksoni i povećava se ispoljavanje gena koji su biljezi diferencijacije neurona [154].

Navedeni spoznaje ukazuju da, slično kao EZH2 i KDM6A, uloga KDM6B u zloćudno promijenjenoj stanici ovisi o njezinom podrijetlu - njegova uloga je stanično-specifična.

1.3. Temeljna obilježja stanice raka ovisna su o višestrukim genskim promjenama

U zloćudno promijenjenoj stanici, osim opisanih, postoji velik broja promjena u različitim genima i njihovim proteinskim produktima, što za posljedicu ima nastanak temeljnih obilježja stanice raka. Promijenjena razina ispoljavanja glasničke RNA i proteinskih produkata nekih gena pokazala se značajnom za razumijevanje hipoteze, ciljeva i rezultata ovog istraživanja.

1.3.1. Ciklin D2

Gen *CCND2* zauzima 31,5 kilobaza na kratkom kraku 12. kromosoma (12p13.32). Prema podatcima dostupnim u bazi podataka NCBI, postoji samo jedna eksperimentalno potvrđena transkripcijska inačica. Translacijom ove glasničke RNA nastaje protein ciklin D2 koji se sastoji od 289 aminokiselina, ukupne molekularne mase ~ 33 kDa.

Ciklin D2, zajedno s ciklinima D1 i D3, čini skupinu proteina "Ciklin D". Ovi proteini imaju ključnu ulogu u regulaciji ciklusa stanice. Nakon što stanica primi mitogeni signal, dolazi do ispoljavanja ciklina D koji potom stupaju u interakciju s ciklin ovisnim kinazama 4 i 6 (CDK 4/6, od engl. *Cyclin-dependent Kinase*). Funkcionalni kompleksi ciklina D i CDK 4/6 nužni su za prolaz stanice kroz restrikcijsku točku u G1-fazi staničnog ciklusa [155, 156]. Prolaz kroz

ovu točku posljedica je fosforilacije proteina pRB, koja je ovisna o kompleksu ciklin D/CDK4/6. Zbog fosforilacije se protein pRB odvaja od čimbenika transkripcije E2F, koji potiče transkripciju gena nužnih za daljnje odvijanje staničnog ciklusa [157].

Ciklin D2 važan je za proliferaciju stanica raka. Specifičnost njegovog djelovanja ovisna je o vrsti stanica. U fibroblastima štakora i miša protoonkogen *c-myc* potiče ispoljavanje ciklina D2, koji, u kompleksu s Cdk4, veže inhibitor ciklin ovisnih kinaza, p27, što za poljedicu ima poticanje aktivnosti ciklin ovisne kinaze 2 (Cdk2) i poticanje staničnog ciklusa [158].

Sicinski i suradnici istražili su ulogu ciklina D2 u granuloznim stanicama jajnika miša. "Knockout" ciklina D2 uzrokovao je neplodnost ženki zbog izostanka proliferacije nakon poticanja hormonom FSH (od engl. *Follicle-stimulating Hormone*). U mužjaka, "knock-out" ciklina D2 uzrokovao je hipoplaziju testisa i smanjeni broj spermija. Autori su potom analizirali razinu ciklina D2 u uzorcima tumora jajnika i testisa, u ljudi. Otkrili su da tumori podrijetlom od granuloznih stanica jajnika imaju značajno veću količinu ciklina D2 u odnosu na pripadajuće tkivo netumora. Sličan fenomen uočen je i u tumorima zametnih stanica testisa [159].

Evron i suradnici opisali su smanjenu razinu ciklina D2 u stanicama raka dojke, u odnosu na pripadajuće tkivo netumora. Pokazali su da je smanjena ekspresija ciklina D2 posljedica hipermetilacije promotora gena za ciklin D2 [160]. Ovaj rad upućuje na činjenicu da ciklin D2 ima i određena protuproliferacijska svojstva, barem u stanicama karcinoma dojke. Druge istraživačke skupine pokazale su smanjeno ispoljavanje ciklina D2 u stanicama raka želuca [161] i raka pluća [162].

U kulturi stanica fibroblasta čovjeka (WI-38, IMR-90, Hs68) kontaktna inhibicija rasta uzrokovala je smanjenje glasničke RNA ciklina B te povećanje glasničke RNA ciklina D2. Presađivanje stanica u nove posude, čime se poništio utjecaj kontaktne inhibicije rasta, uzrokovalo je postepeno smanjenje razine ciklin D2 mRNA tijekom 15 sati. Deprivacija stanica od seruma u mediju također je uzrokovala povećanje razine ciklin D2 mRNA. Ovakve promjene razine ciklin D2 mRNA specifične su samo za ovaj ciklin D. U istim uvjetima razina ciklina D1 opada, dok razina ciklina D3 nije značajno promijenjena. Autori su također uočili da je u uvjetima uspostavljene kontaktne inhibicije rasta stanica, uz depleciju seruma, ciklin D2 vezan u kompleks s ciklin ovisnim kinazama CDK2 i CDK4, ali ne i s CDK6 [163]. Ovo upućuje na različite uloge pojedinih ciklina D u odgovoru na uvjete rasta kojima su stanice izložene.

Analiza 57 uzoraka raka debelog crijeva i okolnog pridruženog netumorskog tkiva pokazala je da je ciklin D2 prekomjerno ispoljen u 53% tumora (30/57). Također, u istim tumorima trećeg ili četvrtog stadija (klasifikacija TNM) ciklin D2 bio je pojačano ispoljen u odnosu na ostale cikline obitelji D; ciklin D2 (68%; 13/19 uzoraka) u odnosu na ciklin D1 (37%, 7/19 uzoraka, p=0,1) i ciklin D3 (32%, 6/19 uzoraka, p=0,05). Autori su također analizirali prisutnost pojedinih ciklina D u stanicama adenokarcinoma, kolona HT-29. Analizom western blot je u ovim stanicama pokazana prisutnost ciklina D1 i D3, ali ne i ciklina D2 [164]. Takano i suradnici proučavali su ispoljenost nekoliko različitih ciklina, ciklin ovisnih kinaza i njihovih inhibitora u uzorcima raka želuca. Prekomjerno ispoljavanje ciklina D2 opaženo je u 34% slučajeva, a njegovo prisustvo u citoplazmi (pokazano metodom imunohistokemije) povezano je s napredovanjem bolesti i lošom prognozom [165].

1.3.2. Transformirajući čimbenik rasta beta 1

Obitelj transformirajućih čimbenika rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor Beta; TGF-* β) čini više od 30 proteina koji imaju vrlo važne uloge u razvoju i rastu organizma, regulaciji proliferacije stanica i njihove diferencijacije, sintezi i razgradnji izvanstaničnog matriksa, regeneraciji tkiva, zacjeljivanju rana i drugim biološkim procesima [166, 167, 168]. Unutar ove obitelji nalazi se podskupina TGF- β po kojoj je cijela obitelj dobila ime. Ovu podskupinu citokina u sisavaca čine tri člana: TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3.

Od posebnog interesa za ovaj rad je protein TGF- β 1 (NCBI ID: 7040, UniProt: P01137). TGF- β 1 kodiran je genom *TGFB1* koji zauzima 23,6 kilobaza na dugačkom kraku 19. kromosoma (19q13.2). Transkripcijom gena nastaje samo jedna eksperimentalno potvrđena transkripcijska inačica koja se sastoji od sedam eksona. Kao i ostali članovi podskupine TGF- β , polipeptid TGF- β 1 sintetizira se kao prekursor koji se sastoji od tri dijela. Amino terminalni dio sadrži signalni slijed kojim se peptid prilikom sinteze upućuje u endoplazmatski retikulum, nakon čega se uklanja iz polipeptida. Središnji dio peptida, LAP (od engl. *Latency Associated Peptide*) nužan je za pravilno smatanje i dimerizaciju C-terminalnog dijela, koji je zreli i funkcionalni oblik TGF- β [169]. C-terminalni odsječak propeptida sadrži devet cisteinskih ostataka, od kojih osam formira intramolekularne cistinske disulfidne mostove, a jedan cistein formira intermolekularni disulfidni most s drugom molekulom TGF- β [168]. U endoplazmatskom retikulumu dolazi do kidanja kovalentne veze između središnjeg i C-terminanog dijela prekursora TGF- β . Ta dva dijela ostaju vezana nekovalentnim vezama i čine kompleks SLC (od engl. *Small Latent TGF-\beta Complex*), koji se disulfidnom vezom veže s
proteinom LTBP (od engl. *Latent TGF-\beta Binding Protein*). Nastali kompleks naziva se LLC (od engl. *Large Latent TGF-\beta Complex*) i izlučuje se iz stanice u međustanični prostor [170, 171]. LLC se veže na komponente izvanstaničnog matriksa; TGF- β je u ovom kompleksu inaktivan [172]. Njegova aktivacija povezana je s oslobađanjem iz LLC, što je posredovano različitim mehanizmima. Najzanimljvije jest da se aktivni TGF- β oslobađa zbog kontrakcije stanica, posredovano mehaničkom silom [173]. Matriks metaloproteinaze 2 i 9 mogu proteolitičkim djelovanjem osloboditi TGF- β iz LLC [174]. BMP1 (od engl. *Bone Morphogenetic Protein 1*) također može proteolitički cijepati LTBP i osloboditi TGF- β [175].

Receptori za TGF- β su tetraheteromeri, sastavljeni od po dvije podjedinice transmembranskih serin/treonin kinaza receptora tipa 1 i tipa 2. U kralježnjaka je, za sada, poznato sedam receptora tipa 1 i pet receptora tipa 2 koji, u različitim kombinacijama, čine funkcionalne receptore za sve članove superobitelji TGF- β [176]. Prijenos signala u unutrašnjost stanice započinje vezanjem TGF- β na dimer receptora tipa 2 koji je autofosforiliran i konstitutivno aktivan. Potom se kompleks TGF- β i receptora tipa 2 veže s dimerom receptora tipa 1 čime nastaje aktivan receptorski kompleks. Nakon ovog vezanja, podjedinice receptora tipa 2 fosforiliraju podjedinice receptora tipa 1 na nekoliko serinskih i treoninskih ostataka unutar visoko konzervirane GS-domene. Fosforilacija podjedinica receptora tipa 1 stvara vezna mjesta za podskupinu proteina SMAD (od engl. *Mothers Against Decapentaplegic (MAD) Homolog*) [177, 178].

Skupina proteina SMAD (homolozi proteina Mad u oganizmu *Droshophila melanogaster* i proteina Sma u organizmu *Caenorhabditis elegans*) odgovorni su za prijenos signala od TGFβ receptora u stanicu. Podijeljeni su u tri skupine [179]:

- Receptorom regulirani proteini: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8/9;
- Inhibitorni proteini: SMAD6, SMAD7;
- Protein-posrednik SMAD4.

Nakon aktivacije receptora za TGF-β, proteini SMAD2 ili SMAD3 vežu se za novonastala vezna mjesta te ih podjedinica receptora tipa 1 fosforilira na dva serinska ostatka, na C-teminalnom dijelu proteina. Ova fosforilacija omogućuje stvaranje dimera SMAD2 i SMAD3 te vezanje s proteinom SMAD4 koji se veže na sve, receptorom regulirane proteine SMAD nakon njihove fosforilacije [180]. Kompleks SMAD2/SMAD3 i SMAD4 ulazi u jezgru stanice i potiče ili utišava transkripciju ciljnih gena, ovisno o vrsti stanice [181, 182]. Inhibitorni proteini SMAD služe kao negativni regulatori aktivnosti TGF-β/SMAD. Na primjer, SMAD7

može se vezati za podjedinicu aktiviranog receptora tipa 1 i spriječiti fosforilaciju SMAD2 [183] ili posredovati ubikvitinaciji i posljedičnoj razgradnji receptora TGF-β [184].

Aktivirani receptori TGF- β mogu aktivirati i druge signalne putove, neovisne o proteinima SMAD (nekanonski signalni putovi TGF- β). Na primjer, pokazano je da TGF- β može aktivirati signalni put mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) [185,186] ili PI3K/AKT/mTOR signalni put [187,188].

1.3.2.1. Zloćudni tumori i signalni put posredovan transformirajućim čimbenikom rasta beta

Uloga signalnog puta TGF- β u zloćudnim je tumorima dvojaka. U početnim stadija razvoja bolesti TGF- β djeluje kao tumor supresor. Međutim, tijekom progresije bolesti stanice raka često postaju otporne na tumor supresivni utjecaj TGF- β . Tada dolazi do prevage "negativnih" učinaka TGF- β : poticanja imunosupresije, angiogeneze, invazije i metastaziranja [189, 190].

Inhibitorni potencijal signalnog puta TGF- β se u odnosu na nastanak tumora temelji na nekoliko različitih mehanizama:

1.TGF- β u liniji stanica adenokarcinoma gušterače Panc-1 potiče ispoljavanje dobro poznatog tumor supresorskog gena *CDKN1A*. Isti učinak nije bio opažen u linijama stanica raka gušterače koje imaju mutacije u TGF- β receptor podjedinici tipa dva ili u proteinu SMAD4 [191];

2. Također, prekomjerno ispoljavanje SMAD4 proteina u stanicama raka dojke MDA-MB-468 dovelo je do povećanja razine proteina P21 i zaustavljanja rasta stanica [192];

3. U liniji stanica adenokarcinoma endometrija HEC-1A, aktivnost TGF-β potiče povećanje razine proteina P27 i njegovu translokaciju u jezgru. Posljedica je zaustavljanje staničnog ciklusa u kasnoj G1-fazi. Utišavanje P27 korištenjem tehnologije siRNA ukinulo je učinak TGF-β na stanični ciklus [193];

4. Jang i suradnici pokazali su, na liniji stanica hepatocelularnog karcinoma Hep3B, da TGF-β uzrokuje apoptozu povećanjem ispoljavanja kinaze DAP (od engl. *Death Associated Protein*). Inhibicija ove kinaze za posljedicu je imala smanjenu stopu apoptoze [194].;

5. Korah i suradnici pokazali su, na stanicama raka jetre, melanoma i imortaliziranim keratinocitima, da TGF-β potiče apoptozu, ovisno o proteinu E2F1. Utišavanje E2F1 je gotovo u potpunosti spriječilo apoptozu stanica, nakon izlaganja TGF-β [195].

Iako je povećano ispoljavanje TGF- β primijećeno u tumorima, veliki broj analiziranih tumora posjeduje mutacije u genima koji kodiraju proteine koje signalni put TGF- β može modulirati, te na taj način isključuit tumor supresivno djelovanje ovog signalnog puta. Opisane su, na primjer, mutacije u podjedinicama receptora za TGF- β tip 1 i 2 te mutacije u SMAD2, SMAD3 i SMAD4 [196, 197].

Protumorski učinci TGF- β mogu se očitovati na razini stanica tumora i na razini stanica strome. Na primjer, na modelu ksenografta stanica raka dojke MDA-MB-231 u golih miševa pokazano je da "knock-down" SMAD4 u stanicama smanjuje njihov potencijal za stvaranje osteogenih metastaza [198].

1.4. Senzibiliziranje stanice na cisplatinu farmakološkim moduliranjem razine H3K27me3

1.4.1. Tazemetostat – inhibitor EZH2

Tazemetostat (zaštićeno ime: Tazverik®), poznat pod nazivom EPZ-6438, snažan je, selektivan inhibitor enzima EZH2 (Slika 2). Razvile su ga tvrtke Epizyme i Eisai. Tazemetostat djeluje kao kompetitivni inhibitor EZH2; natječe se sa S-adenozil metioninom za vezanje na katalitičku domenu EZH2. Pokazuje 35 puta veću selektivnost prema EZH2 (IC₅₀ 2,5 nM) nego prema EZH1 te nekoliko tisuća puta veću selektivnost u odnosu na ostale histon metiltransferaze [199]. Učinkovitost protutumorskog djelovanja tazemetostata pokazana je na različitim pretkliničkim modelima, *in vitro* i *in vivo*. Na primjer, u rabdomioidnim tumorima [199], ne-Hodgkin limfomu [200], karcinomu jajnika malih stanica [201], karcinomu Merkelovih stanica [202], hordomu [203] i drugim modelima. Važno je napomenuti da su, u većini istraženih modela, u stanicama/tumorima prisutne mutacije ili delecije proteina koji su dio kompleksa SWI/SNF (antagonist PRC2), ili su prisutne mutacije i/ili prekomjerno ispoljavanje EZH2.

Učinkovitost tazemetostata, u monoterapiji ili u kombiniranom liječnju u onkologiji, predmet je desetak kliničkih ispitivanja. Pretraživanjem baze kliničkih ispitivanja, ClinicalTrials.gov, korištenjem ključnih riječi "cancer" i "tazemetostat", pronađena je 41 studija. Najveći broj studija usredotočen je na ispitivanje tazemetostata u liječenju različitih vrsta limfoma. Međutim, učinak tazemetostata ispituje se i za liječenje velikog broja drugih zloćudnih oboljenja. Od 41 studije, devet je završeno, jedna studija je suspendirana, jedna prijevremeno zavšena i jedna povučena. Trenutno su aktivne 23 studije, a šest je tek odobreno. U trenutku

pisanja ovog rada, tazemetostat je odobren od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. *U.S. Food and Drug Administration*; FDA) za liječenje epiteloidnog sarkoma i refraktornog folikularnog limfoma [204].



Slika 2. Struktura tazemetostata

1.4.2. GSK-J4 – inhibitor KDM6A i KDM6B

GSK-J4 je derivat spoja GSK-J1 koji je snažan i selektivan inhibitor dva enzima, KDM6A i KDM6B, članova obitelji histon lizin demetilaza. GSK-J1 se natječe s α-ketoglutaratom za vezanje na enzime, dok je vezanje supstrata za enzim neometano. Budući da GSK-J1 sadrži visoko polarnu karboksilnu skupinu (Slika 3), ima ograničenu sposobnost prolaska kroz lipofilnu staničnu membranu. Acetilacijom karboksilne skupine spoja GSK-J1 nastaje spoj GSK-J4 koji prolazi kroz staničnu membranu. Unutar stanica se GSK-J4 deacetilira staničnim esterazama i pretvara u aktivan spoj – GSK-J1 [205, 206]. Nužno je napomenuti da su Heinemann i suradnici otkrili da spojevi GSK-J1/GSK-J4 inhibiraju i enzime KDM5B i KDM5C – histon lizin demetilaze koje demetiliraju metiliranu aminokiselinu lizin na položaju 4 u histonu H3 [207].



Slika 3. Strukture spojeva GSK-J1 (lijevo) i GSK-J4 (desno)

Protutumorski učinak GSK-J4, u slučaju samostalne primjene, ili u kombinaciji s drugim protutumorskim lijekovima, pokazan je na različitim pretkliničkim modelima, *in vitro* i *in vivo*. Na primjer: anaplastičnom raku štitnjače [208], adenokarcinomu pluća s mutacijom u genu *KRAS* [209], raku pluća i karcinomu jajnika malih stanica s mutacijama u genu *SMARCA4* [210], akutnoj mijeloidnoj leukemiji [211] i drugim modelima. Usprkos tomu, učinkovitost spoja GSK-J4 još uvijek nije istražena u kliničkim studjama.

1.4.3. Cisplatina

Cisplatina je protutumorski lijek, odobren 1978. godine od strane FDA za liječenje raka testisa. Danas se cisplatina koristi, kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim lijekovima, za liječenje različitih tumora: raka mokraćnog mjehura, grlića maternice, jajnika, testisa, raka pluća nemalih stanica, raka glave i vrata [212].

Cisplatina u stanicu ulazi putem visoko afinitetnog transportera za bakar CTR1 (SLC31A1) [213]. Nakon ulaska u stanicu dolazi do izmjene atoma klora s molekulama vode. Novonastali spoj je elektrofilan i reagira s molekulama koje su bogate elektronima, kao što su dušične baze nukleinskih kiselina [214]. Reagirajući s molekulom DNA, cisplatina primarno dovodi do stvaranja veza između dvije susjedne purinske baze unutar istog lanca. Najčešće je riječ o stvaranju veze između dva susjedna gvanina (GpG), ili adenina i gvanina (ApG) [215].

Cisplatina uzrokuje stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki, što rezultira povećanim oksidacijskim stresom u stanici, koji može uzrokovati oštećenje proteina, lipida i nukleinskih kiselina [215, 216]. Oksidacijski stres također potiče aktivaciju gena uključenih u apoptozu, što zajedno s ostalim oštećenjima dovodi do programirane smrti stanice. U slučaju izrazitog oksidacijskog stresa, nastala oštećenja mogu rezultirati i nekrozom [217]. Pokazano je da u

nekim eksperimentalnim modelima učinak cisplatine ovisi o unutarstaničnoj razini glukoze [218], te da linije stanica raka neosjetljive na cisplatinu imaju povećanu potrebu za glukozom [219, 220].

Zbog navedenih molekularnih mehanizama, djelovanje cisplatine nije selektivno. Posljedica neselektivnosti su izraženi neželjeni učinci poput mučnine i povraćanja, nefrotoksičnosti, neurotoksičnosti, oštećenja sluha, supresije koštane srži, oštećenja pluća, neplodnosti. U konačnici može posredovati u razvoju sekundarnih tumora [221, 222].

Osim neselektivnog djelovanja , dodatni problem je razvoj otpornosti zloćudno promijenjene stanice. Poznato je nekoliko različitih mehanizama koji pridonose razvoju smanjene osjetljivosti: smanjenje unutarstanične razine cisplatine, zbog smanjenog unosa ili odstranjivanja cisplatine iz stanice, te zbog povećane sinteze glutationa, koji se izravno veže na molekulu cisplatine. Osim mehanizama koji izravno djeluju na molekulu cisplatine, postoje i mehanizmi rezistencije koji se nalaze "nizvodno" - nakon vezanja cisplatine na DNA. Ovo uključuje povećano ispoljavanje proteina koji sudjeluju u popravku oštećenja molekule DNA izrezivanjem nukleotida (engl. *Nucleotide Excision Repair*; NER) ili u popravku dvolančanih lomova (DBS, od engl. *Double Strand Brake*) molekule DNA. Također, smanjena aktivnost sustava koji aktivira apoptozu stanica u odgovoru na oštećenje molekule DNA ili mutacije u proteinima koji sudjeluju u procesu apoptoze, mogu stanice učiniti rezistentnim na cisplatinu [223, 224].

Fenotip stanica koje su otporne na cisplatinu, između ostalog, proizlazi i iz genetičkih i epigenetičkih promjena koje postoje u stanici. Za razliku od genetičkih promjena, koje su u pravilu trajne, epigenetičke promjene su dijelom reverzibilne, što ih čini zanimljivim metama, važnim u prevladavanju otpornosti na veliki broj protutumorskih lijekova, uključujući i cisplatinu [225, 226].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti postojanje učinka: aditivnog ili sinergističkog, primjenom spojeva tazemetostat/GSK-J4 u kombinaciji s cisplatinom *in vitro*, na stanice podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata te zloćudnog tumora debelog crijeva određivanjem vijabilnosti, proliferacije, apoptoze i promjenom udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa.

2. Istražiti ovisnost učinka o razini glukoze u mediju.

3. Istražiti molekularno-genetičku podlogu opaženih promjena na razini mRNA, i na razini proteina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Linije stanica

Za izradu doktorskog rada korištene su tri trajne linije stanica raka; dvije linije stanica podrijetlom od zloćudih tumora glave i vrata te jedna linija stanica podrijetlom od adenokarcinoma debelog crijeva. Navedene linije su:

- FaDu podrijetlom od karcinoma donjeg dijela ždrijela [227];
- Detroit 562 podrijetlom od metastaza (pleuralni izljev) karcinoma ždrijela [228];
- HT-29 podrijetlom od adenokarcinoma debelog crijeva [229].

Sve linije stanica nabavljene su od ATCC (American Type Culture Collection, SAD) i pohranjene u tekući dušik.

3.1.2. Materijali i kemikalije za uzgoj stanica

- Bočice površine 75 cm² s ventiliranim čepom (SARSTEDT AG & Co. KG, Njemačka);
- Bočice površine 25 cm² s ventiliranim čepom (SARSTEDT AG & Co. KG, Njemačka);
- Pločice s 96 jažica (96-well plate, Sigma-Aldrich, SAD);
- Konusne epruvete od 15 mL (Greiner Bio-One, Njemačka);
- Hemocitometar Bürker-Türk (Brand, Njemačka);
- Medij DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high glucose (Sigma-Aldrich, SAD, [D5796]);
- Medij DMEM low glucose (Sigma-Aldrich, SAD, [D6046]);
- Serum fetusa goveda (FCS od engl. Fetal Calf Serum) (Sigma-Aldrich, SAD, [F7524]);
- Otopina 0,25% Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, SAD, [T4049]);
- Otopina tripanskog modrila (Sigma-Aldrich, SAD);
- 1 x pufer PBS (od engl. *Phosphate Buffer Saline*): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4.

3.1.3. Korištena otapala i spojevi

Istraživao se učinak tri spoja, zasebno i u kombinaciji, te otapala u kojemu su spojevi bili otopljeni.:

- Dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, SAD);
- Cisplatina (Cayman Chemical Company, SAD); otopljena u fiziološkoj otopini; koncentracija originalne ("stock") otopine 1666,7 μM;
- Tazemetostat (Cayman Chemical Company, SAD); otopljen u DMSO; koncentracija originalne ("stock") otopine 5 mM;
- GSK-J4 (Sigma-Aldrich, SAD); otopljen u DMSO; koncentracija originalne ("stock") otopine 5 mM.

3.1.4. Mjerenje vijabilnosti i proliferacije stanica

- Komplet kemikalija za mjerenje vijabilnosti stanica "EZ4U Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay BI-5000" (Biomedica, Austrija);
- Komplet kemikalija za mjerenje proliferacije stanica "Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)" (Roche, Švicarska).

3.1.5. Određivanje staničnog ciklusa i apoptoze

- Komplet kemikalija za određivanje staničnog ciklusa "Muse Cell Cycle Kit" (Luminex Corporation, SAD);
- Komplet kemikalija za određivanje apoptoze "Muse Annexin V & Dead Cell Kit" (Luminex Corporation, SAD).

3.1.6. Izdvajanje ukupne RNA i pročišćavanje od zaostale genomske DNA

- "TRIzol" (Invitrogen, SAD);
- Kloroform p.a. (Kemika, Hrvatska);
- Izopropanol p.a. (CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka);
- Etanol, 70%, pripravljen iz 100% (CARLO ERBA Reagents GmbH, Njemačka);

- Komplet kemikalija za uklanjanje genomske DNA "gDNA Removal kit" (Jena Bioscience GmbH, Njemačka);
- Sterilna deionizirana voda.

3.1.7. Obrnuto prepisivanje

- Komplet kemikalija "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems, SAD);
- Početnice "Oligo(dT)₂₃, Anchored" (Sigma-Aldrich, SAD);
- Sterilna deionizirana voda.

3.1.8. Lančana reakcija polimeraze (PCR) i elektroforeza u gelu agaroze

- "AmpliTaq Gold[™] 360 Master Mix" (Applied Biosystems, SAD);
- "360 GC Enhancer" (Applied Biosystems, SAD) ;
- Sterilna deionizirana voda;
- Agaroza "BioReagent", za molekularnu biologiju, niske elektroendoosmotske jakosti (Sigma-Aldrich, SAD);
- 1 x pufer TAE (od engl. *Tris-acetate-EDTA*): 20 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0;
- Pufer za nanošenje uzoraka: 0,25% ksilen-cijanol, 0,25% bromfenolno modrilo, 50% glicerol;
- Standard "Lambda DNA/HindIII Marker" (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- Standard "100 bp DNA Ladder" (Invitrogen, SAD);
- Početnice za "end-point" PCR (Tablica 1) (Metabion International AG, Njemačka).

Naziv početnice	Slijed nukleotida	Veličina odsječka (pb)	Tm (°C)
GAPDH 1	5'AACGGATTTGGTCGTATTGGGC 3'	GAPDH 1 + 2 = 600 bp	59
GAPDH 2	5'AGGGATGATGTTCTGGAGAGCC 3'		59
GAPDH 3	5'AAGCTGACTCAGCCCTGCAAAGG 3'	GAPDH $2 + 3 = 644$ bp	59

Tablica 1. Početnice za "end-point" PCR

3.1.9. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (**RT-qPCR**) i TaqMan Gene Expression Array

- "TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulation" (Applied Biosystems, SAD);
- "TaqMan Fast Advanced Master Mix" (Applied Biosystems, SAD);
- Sterilna deionizirana voda;
- "PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix" (Applied Biosystems, SAD);
- "MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate" (Applied Biosystems, SAD);
- Početnice za RT-qPCR (Tablica 2) (Metabion International AG, Njemačka).

3.1.10. Izdvajanje proteina i određivanje njihove koncentracije

- "RIPA Lysis and Extraction Buffer" (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- "NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents" (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- 1 x pufer PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4;
- "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 450 ml" (Bio-Rad Laboratories, SAD);
- Strugalice za sakupljanje lizata "Cell Scraper and Cell Spatula [99002]" (TPP Techno Plastic Products AG, Švicarska);
- Albumin seruma goveda (BSA, od engl. *Bovine Serum Albumin*) (Cell Signaling Technology, SAD);
- Sterilna deionizirana voda.

Tablica 2. Početnice za RT-qPCR.

Naziv	Sliind multiontide	Veličina	$\mathbf{T}_{\mathbf{m}}$ (° C)
početnice	Sujeu nukleouua	odsječka (pb)	Im(C)
PPIA F	5'GACTGAGTGGTTGGATGGCA 3'	77	60
PPIA R	5'GCTCCATGGCCTCCACAATA 3'		60
IPO8 F	5' CACCACTCAGCGAGGATCAG 3'	87	63
IPO8 R	5' TCTTCTTTGCCTCTGCCACC 3'	07	60
p18 F	5' CCTGATCGTCAGGACCCTA 3'	172	59
p18 R	5' GGATTTCCAAGTTTCATAACCTGC 3'	1/2	62
p19 F	5' GCAGGTCATGATGTTTGGCAG 3'	107	61
p19 R	5' CTGCGTCATGGACTGGACTG 3'	107	63
p21 F	5' GACCATGTGGACCTGTCACT 3'	131	60
p21 R	5' TGGTAGAAATCTGTCATGCTGGT 3'	151	61
CCND2 F	5' TCCTGGCCTCCAAACTCAAA 3'	132	58
CCND2 R	5' GGTTCCACTTCAACTTCCCCA 3'	152	61
CDK2 F	5' TGGGCCCGGCAAGATTTTAG 3'	105	60
CDK2 R	5' GGCCGAAATCCGCTTGTTAG 3'	100	60
TGFB1 F	5' GGAAATTGAGGGCTTTCGCC 3'	90	60
TGFB1 R	5' CCGGTAGTGAACCCGTTGAT 3'	20	60
TGFB3 F	5' ACCTCCAAGGTTTTCCGCTT 3'	146	58
TGFB3 R	5' GGCCGAAGGATCTGGAAGAG 3'	110	63
KDM6B F	5' CACCTTGAGCACAAACGGAA 3'	173	58
KDM6B R	5' GTCTGTTCAGAGTTGCAGCC 3'	1/5	60
EZH2 F	5' TCCGGGATGCCGCTGCAAAG 3'	209	63
EZH2 R	5' AAATCCCCCCAGCCTGCCACG 3'	207	63

3.1.11. Western blot

- Pufer za denaturaciju i nanošenje uzoraka (Laemmli pufer): 300 mM Tris-HCl pH 6,8, 250 mM DTT, 50% glicerol, 10% SDS, 0,02% bromfenolno modrilo;
- 30% otopina akrilamida: akrilamid/bis-akrilamid 29:1 (Sigma-Aldrich, SAD);
- Pufer za gel 1(sabijanje): 500 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS;

- Pufer za gel 2 (razdvajanje): 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS;
- Sterilna deionizirana voda;
- 10% amonijev persulfat (APS) (Sigma-Aldrich, SAD);
- N,N,N',N'-tetrametiletilenediamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, SAD);
- 1 x pufer za elektroforezu: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS;
- 1 x pufer za transfer proteina: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol;
- Nitrocelulozna membrana veličine pora 0,2 µm "Roti-NC, transfer membrane" (Carl Roth GmbH, Njemačka);
- Otopina Ponceau S (Sigma-Aldrich, SAD, [P7170]);
- 1 x pufer TBS (od engl. Tris-Buffered Saline): 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,6;
- 1 x pufer TBST: 1 x pufer TBS, 0,1% Tween 20;
- Albumin seruma goveda (Cell Signaling Technology, SAD);
- Nemasno mlijeko u prahu (Cell Signaling Technology, SAD);
- Proteinski standard "Color-coded Prestained Protein Marker, Broad Range (10-250 kDa) #74124" (Cell Signaling Technology, SAD);
- Primarna i sekundarna protutijela opisana su u Tablici 3. Sva protutijela, osim anti-JMJD3, nabavljena su od proizvođača Cell Signaling Technology (SAD). Protutijelo anti-JMJD3 nabavljeno je od proizvođača Thermo Fisher Scientific (SAD). Sva primarna protutijela podrijetlom su iz kunića (Rabbit), dok je sekundarno protutijelo, koje prepoznaje imunoglobulin G (IgG) kunića, podrijetlom iz koze (Goat). Sva protutijela razrijeđena su u omjeru 1:1000, u 5% otopini BSA u puferu TBST, ili u 5% otopini nemasnog mlijeka u puferu TBST, prema uputama proizvođača.

Tablica 3. Protutijela korištena za Western blot.

Protutijelo	Ciljni protein	Vrsta protutijela	
p21 Waf1/Cip1 (12D1) Rabbit mAb #2947	P21		
Cyclin D2 (D52F9) Rabbit mAb #3741	ciklin D2		
TGF-β (56E4) Rabbit mAb #3709	TGFB1 i TGFB3		
p53 (7F5) Rabbit mAb #2527	P53	Primarno -	
Ezh2 (D2C9) XP Rabbit mAb #5246	EZH2	Monokionsko	
GAPDH (D16H11) XP Rabbit mAb #5174	GAPDH		
TBP (D5C9H) XP Rabbit mAb #44059	TBP		
β-Actin (D6A8) Rabbit mAb #8457	Beta aktin		
IMID3 Polyclonal Antibody #PA5 72751	IMID3	Primarno -	
JWJD3 Folycional Antibody #FA3-72751	JIVIJD5	Poliklonsko	
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	IgG kunića	Sekundarno	

3.1.12. Imunofluorescencija

- Pločice s 24 jažice "Nunc[™] Cell-Culture Treated Multidishes" [142475] (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- Pokrovna stakalaca "Coverslips thickness 1 round, Ø: 12 mm" (Carl Roth GmbH, Njemačka);
- Predmetna stakalca "Microscope Slides 76x26 mm" (Waldemar Knittel Glasbearbei- tungs GmbH, Njemačka);
- Pufer PBS;
- "Normal Goat Serum Blocking Solution S-1000" (Vector Laboratories, SAD);
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD);
- Otopina za fiksiranje stanica: 4% otopina paraformaldehida u puferu PBS (Sigma-Aldrich, SAD);
- Albumin seruma goveda (BSA) (Cell Signaling Technology, SAD);
- boja DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole] (Cell Signaling Technology, SAD);
- "ProLong Gold Antifade Reagent" (Cell Signaling Technology, SAD);
- Otopina za blokiranje: pufer PBS, 5% serum koze, 0.3% Triton X-100;
- Otopina za protutijela: pufer PBS, 1% BSA, 0.3% Triton X-100;

- Monoklonsko primarno protutijelo iz kunića "Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb #9733" (Cell Signaling Technology, SAD); razrijeđeno u omjeru 1:1000 u otopini za protutijela;
- Sekundarno protutijelo koje se veže na imunoglobuline (IgG) kunića "Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')2 Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate) #4412" (Cell Signaling Technology, SAD); razrijeđeno u omjeru 1:1000 u otopini za protutijela.

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanica

Stanice su odmrznute i nasađene u bočice površine 75 cm² s ventiliranim čepom, u mediju DMEM s 4,5 g/L glukoze uz dodatak 10% FCS, u inkubatoru u vlažnoj atmosferi s 5% CO2 pri 37°C.

Nakon odmrzavanja stanica i uzgoja u bočicama od 75 cm² stanice su, za potrebe pokusa, odvojene od podloge otopinom 0,25% (w/v) Tripsin-0,53 mM EDTA. Nakon odvajanja stanica od podloge tripsin je neutraliziran dodatkom svježeg medija DMEM s 10% FCS. Otopina koja je sadržavala odvojene stanice prebačena je u sterilne konusne epruvete od 15 ml (Greiner Bio-One, Njemačka) i centrifugirana 5 minuta pri 300 x g. Supernatant je uklonjen, a zaostale stanice su resuspendirane u 1 mL medija. 20 μ L otopine stanica pomiješano je s 180 μ L otopine tripanskog modrila i korišteno je za određivanje broja živih stanica korištenjem hemocitometra Bürker-Türk (Brand, Njemačka) i metode tripan modrilo isključujućeg eseja.

U daljnjim pokusima stanice su uzgajane u dvije vrste medija:

- DMEM s 4,5 g/L (25 mM) glukoze uz dodatak 10 % FCS;
- DMEM s 1 g/L (5,55 mM) glukoze uz dodatak 10% FCS.

3.2.2. Određivanje vijabilnosti i proliferacije stanica

Vrijeme i način izlaganja stanica određenim spojevima ili njihovim kombinacijama razlikovalo se, ovisno o samim spojevima. Shema izlaganja stanica spojevima prikazana je u Tablici 4.

Ispitivani spojevi	Nasađivanje stanica	Prvo izlaganje, 24h nakon nasađivanja (0h)	24 h	48 h	72 h
Cisplatina (24h)	100 μL medija	100 μL medija + cisplatina	Mjerenje		
Cisplatina (48h)	100 μL medija	100 μL medija + cisplatina	/	Mjerenje	
Tazemetostat/ DMSO	100 μL medija	100 µL medija + tazemetostat/DMSO	/	/	Mjerenje
GSK-J4	100 μL medija	100 μL medija + GSK-J4	/	/	Mjerenje
Cisplatina + tazemetostat	100 μL medija	50 μL medija + tazemetostat	50 μL medija + cisplatina + tazemetostat	/	Mjerenje
Cisplatina + tazemetostat ili GSK-J4	100 μL medija	50 μL medija + tazemetostat ili GSK- J4	50 μL medija + cisplatina + tazemetostat ili GSK-J4	/	Mjerenje

Tablica 4. Protokol izlaganja stanica odabranim spojevima.

U svim uvjetima uzgoja, početni uvjeti bili su isti: 3000 stanica nasađeno je u 100 μ L ranije opisanih medija, u pločice s 96 jažica. Spojevi od interesa pomiješani su s medijem koji je potom dodan stanicama u naznačenom volumenu. Konačni volumen medija u kojem su stanice uzgajane, nakon dodatka svih spojeva, iznosio je 200 μ L.

3.2.2.1. Mjerenje vijabilnosti stanica

Za mjerenje vijabilnosti stanica korišten je komercijalno dostupan pribor kemikalija "EZ4U – Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay BI-5000", prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon što su stanice inkubirane sa spojevima u predviđenim vremenskim intervalima, dodano im je 20 µL supstrata a potom su inkubirane sat vremena u inkubatoru pri standardnim, ranije opisanim, uvjetima. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini 450 nm, na kojoj apsorbira nastali obojeni produkt (formazan) i na valjnoj duljini 620 nm, koja je korištena kao referentna vrijednost. Apsorbancija je izmjerena korištenjem instrumenta "EZ Read 2000 Microplate Reader" (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo). Izmjerene vrijednosti za pojedine eksperimentalne uvjete uspoređene su s vrijednostima kontrolnog uvjeta (stanice uzgojene bez dodatka ispitivanih spojeva).

3.2.2.2. Određivanje proliferacije stanica

Za određivanje proliferacije stanica korišten je komercijalno dostupan pribor kemikalija "Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)" (Roche, Švicarska), prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon izlaganja stanica prethodno spomenutim spojevima ili njihovim kombinacijama, stanicama je dodano 20 μ L otopine koja je sadržavala 5-bromo-2-deoksiuridin i inkubirane su u inkubatoru tijekom dva sata. Nakon toga, medij je odliven, a stanicama je dodano 200 μ L otopine za fiksaciju te su inkubirane 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Otopina je potom odlivena i dodano je 100 μ L otopine koja je sadržavala protutijela koja prepoznaju 5bromo-2-deoksiuridin. Poslije inkubacije (90 minuta, sobna temperatura) otopina je odlivena, a jažice su isprane otopinom za ispiranje, tri puta po 300 μ L. Nakon ispiranja, u jažice je dodano 100 μ L otopine sa supstratom. Inkubacija je trajala do razvoja boje, nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 25 μ L otopine 1 mM sumporne kiseline. Apsorbancija je izmjerena na valnoj duljini 450 nm, na kojoj apsorbira nastali obojeni produkt te 620 nm (referentna vrijednosti). Apsorbancija je izmjerena korištenjem insrumenta "EZ Read 2000 Microplate Reader". Dobivene vrijednosti za pojedine eksperimentalne uvjete uspoređene su s vrijednostima kontrolnog uvjeta (stanice uzgojene bez dodatka ispitivanih spojeva).

3.2.3. Konačna uspostava modela istraživanja

Na temelju podataka dobivenih analizom vijabilnost i proliferacije stanica definirani su konačni eksperimentalni uvjeti koji su korišteni u svim daljnjim pokusima: korišten je medij DMEM s 4,5 g/L (25 mM) glukoze uz dodatak 10 % FCS. Eksperimentalni uvjeti bili su sljedeći:

- 1) Kontrolni uvjet (stanice uzgojene bez dodatka spojeva);
- 2) DMSO stanice izložene samo otapalu DMSO;
- 3) Tazemetostat stanice izložene samo tazemetostatu;
- 4) GSK-J4 stanice izložene samo spoju GSK-J4;
- 5) Cisplatina stanice izložene samo cisplatini;
- 6) Cisplatina + DMSO stanice izložene otapalu DMSO i cisplatini;

- 7) Cisplatina + tazemetostat stanice izložene tazemetostatu i cisplatini;
- 8) Cisplatina + GSK-J4 stanice izložene cisplatini i GSK-J4;

Vremenski intervali izlaganja stanica u svim uvjetima bili su sljedeći (Slika 4.):

- 1) Prvi dan pokusa stanice su nasađene;
- Drugi dan pokusa stanice su izložene spojevima: DMSO ili tazemetostat ili GSK-J4 (eksperimentalne skupine 2, 3, 4, 6, 7 i 8);
- 3) Treći dan pokusa stanice su izložene cisplatini (eksperimentalne skupine 5, 6, 7 i 8);
- 4) 48 sati nakon dodatka cisplatine iz stanica je izdvojen materijal ili su korištene u daljnjim pokusima.



Slika 4. Izlaganja stanica ispitivanim spojevima u odnosu na vrijeme.

3.2.4. Analiza staničnog ciklusa

Za analizu staničnog ciklusa korišten je komercijalno dostupan pribor kemikalija "Muse Cell Cycle Kit". U svaku bočice površine 25 cm² s ventiliranim čepom nasađeno je 300 000 stanica, u 5 mL medija. Nakon uzgoja stanica u ranije navedenim eksperimentalnim uvjetima, stanicama je uklonjen medij i odvojene su od podloge otopinom 0.25% (w/v) Tripsin-0,53 mM EDTA. Tripsin je potom neturaliziran dodatkom svežeg medija s FCS. Stanice su centrifugirane u konusnim epruvetama od 15 mL na 300 x g, na sobnoj temperaturi tijekom pet minuta. Potom je uklonjen medij a stanice su resuspendirane u puferu PBS, nakon kojega su opet centrifugirane. Poslije drugog centrifugiranja PBS je ukonjen, a stanice su resuspendirane u hladnom 70% etanolu i fiksirane preko noći -20°C. Sljedeći dan, 200 µL otopine fiksiranih stanica preneseno je u mikroepruvetu i centrifugirano pri 300 x g, na sobnoj temperaturi tijekom pet minuta. Supernatant je uklonjen i stanice su resuspendirane u puferu PBS i opet centrigirane pri istim uvjetima. Poslije ovog, završnog, centrifugiranja supernatant je uklonjen, a stanice su resuspendirane u 200 µL reagensa "Muse Cell Cycle Reagent" i inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije, uzorci su analizirani korištenjem instrumenta "Guava® Muse Cell Analyzer" (Luminex Corporation, SAD), prema uputi proizvođača.

3.2.5. Analiza apoptoze

Za analizu apoptoze korišten je komercijalno dostupan pribor kemikalija "Muse Annexin V & Dead Cell Kit" koji se temelji na spojevima aneksin V i 7-amino-aktinomicin. U svaku bočicu površine 25 cm² s ventiliranim čepom nasađeno je 300 000 stanica u 5 mL medija, koje su uzgajane u ranije navedenim eksperimentalnim uvjetima. Kao negativna kontrola korištene su stanice uzgajane u kontrolnom uvjetu – bez dodatka ispitivanih spojeva. Kao pozitivna kontrola za apoptozu korištene su stanice dodatno uzgojene u prisustvu nekoliko koncentracija cisplatine (15 µM za FaDu, 20 µM za Detroit 562, 100 µM za HT-29) koja je uzrokovala povećanu stopu apoptoze u odnosu na negativnu kontrolu. Nakon uzgoja, stanicama je uklonjen medij koji je odvojen u konusne epruvete od 15 ml. Stanice su potom odvojene od podloge otopinom 0.25% (w/v) Tripsin-0.53 mM EDTA. Tripsin je neutraliziran s prethodno odvojenim medijem u koji je dodan 1 mL svježeg FCS. Stanice su centrifugirane pet minuta pri 300 x g, nasobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja je supernatant uklonjen, a stanice su resuspendirane u 1 mL pufera PBS koji je sadržavao 2% FCS. Od ove suspenzije stanica uzeto je 100 µL i pomiješano sa 100 µL reagensa "Muse Annexin V & Dead Cell Reagent" u mikroepruveti. Uzorak je promiješan pipetom i inkubiran 20 minuta, na sobnoj temperaturi, u mraku. Uzorci su nakon inkubacije analizirani na korištenjem instrumenta "Guava Muse Cell Analyzer" (Luminex Corporation, SAD) prema uputi proizvođača.

3.2.6. Izdvajanje ukupne RNA

Za izdvajanje ukupne RNA stanice su nasađene u bočice površine 25 cm² s ventiliranim čepom, u 5 mL medija. Ukupna RNA je izdvojena reagensom "TRIzol", prema uputama proizvođača. Stanicama je uklonjen medij i dodan 1 mL otopine "TRIzol", nakon čega su inkubirane na ledu tijekom pet minuta. Sadržaj bočice prenesen je u mikroepruvetu od 2 mL i dodano mu je 200 µL kloroforma. Sadržaj je promiješan u ruci i ostavljen na ledu tijekom 10 minuta. Mikroepruvete su centrifugirane 15 minuta pri 12 000 x g i na 4°C. Nakon centrifugiranja, gornja, vodena, bezbojna faza prenesena je u novu mikroepruvetu od 1,5 mL i dodano joj je 500 µL izopropanola. Smjesa je inkubirana na ledu 10 minuta a potom centrifugirana 10 minuta na 12 000 x g i na 4°C. Prilikom centrifugiranja stvoren je talog RNA. Pipetom je uklonjen supernatant, a talogu su dodana 1,3 mL 70% etanola. Mikroepruvete su kratko vorteksirane i pohranjene na -20°C preko noći. Sljedećeg dana, mikroepruvete su centrifugiranja uklonjen, talog posušen i otopljen u odgovarajućem volumenu sterilne, deionizirane vode.

3.2.7. Određivanje koncentracije i provjera kvalitete izdvojene RNA

Koncentracija RNA određena je spektrofotometrom, korištenjem instrumenta "BioSpec-nano" (Shimadzu, Japan). Osim koncentracije, određen je i omjer apsorbancije na valnim duljinama 260 i 280 nm, koji ukazuje na prisustvo proteina u uzorku, te omjer apsorbancije na valnim duljinama 260 i 230 nm, koji ukazuje na prisustvo kemikalija zaostalih tijekom procesa izdvajanja RNA. Prihvatljive vrijednosti omjera A260/280 bile su 1,9-2,0; a za vrijednosti omjera A260/230 2,2 – 2,3. Za provjeru očuvanosti RNA korištena je elektroforeza u 1% gelu agaroze. Jedan mikrolitar otopine RNA pomiješan je s 10 μ L sterilne deionizirane vode i 1,5 μ L pufera za nanošenje uzoraka te nanesen u gel agaroze. Očuvanost izdvojene RNA procijenjena je na temelju izgleda vrpci koje odgovaraju ribosomalnoj RNA. Jedino RNA koja je imala očuvane vrpce ribosomalne RNA i prihvatljive vrijednosti omjera A260/230 korištena je u daljnjim pokusima. Izdvojena RNA pohranjena je na -80°C.

3.2.8. Uklanjanje genomske DNA iz uzoraka RNA i obrnuto prepisivanje

Prije korištenja u reakciji obrnutog prepisivanja, RNA je pročišćena od kontaminirajuće genomske DNA. Za uklanjanje genomske DNA korišten je komercijalno dostupan komplet kemikalija "gDNA Removal Kit", prema uputama proizvođača. Ukratko, u reakciji pročišćavanja korišteno je 17 μ L RNA, kojoj je dodano 2 μ L pufera "10x Reaction Buffer" i 1 μ L otopine DNaze "gDNA remover". Reakcijska smjesa pomiješana je u mikroepruvetama volumena 0,2 mL i inkubirana u instrumentu "GeneAmp PCR System 2400" (Applied Biosystems, SAD), 20 minuta pri 25°C, te pet minuta pri 58°C stupnjeva kako bi se inaktivirala DNaza. Nakon uklanjanja genomske DNA, koncentracija RNA opet je izmjerena spektrofotometrom.

Za obrnuto prepisivanje korišten je "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" i "Oligo(dT)₂₃" početnice. U reakciji je korišten 1 μg ukupne pročišćene RNA, u ukupnom volumenu od 20 μL. Svaka reakcijska smjesa sadržavala je:

- 10x RT Buffer $-2 \mu L$;
- 25x dNTP Mix (100 mM) 0,8 μL (konačna koncentracija 4 mM);
- Oligo(dT)23, Anchored 1 μ L (konačna koncentracija 3,5 μ M);
- MultiScribe Reverse Transcriptase 1 µL (broj jedinica 50U);
- RNase Inhibitor 0,5 µL (broj jedinica 10 U);
- Nuclease-free $H_2O 4,7 \mu L$;
- RNA i sterilna deionizirana voda $10 \ \mu$ L.

Reakcijska smjesa pomiješana je u mikroepruvetama volumena 0,2 mL i inkubirana u instrumentu "GeneAmp PCR System 2400" u uvjetima:

- 25°C 10 minuta
- 37°C 120 minuta
- $85^{\circ}C 5$ minuta
- 4°C čuvanje uzoraka

Po završetku reakcije, svakoj reakcijskoj smjesi dodano je 80 µL sterilne deionizirane vode, do ukupnog volumena 100 µL. cDNA pohranjena je na -20°C do uporabe.

3.2.9. RT-PCR (konzervativna lančana reakcija polimeraze ("end-point PCR"))

Konzervativna lančana reakcija polimeraze izvedena je korištenjem instrumenta "GeneAmp PCR System 2400". Svaka reakcijska smjesa sadržavala je:

- "AmpliTaq 360 Gold Master Mix" 6,25 µL;
- "GC Enhancer" 0,3 μ L;
- Pomiješani forward i reverse početnice (konc. 5 μM) 1 μL (konačna koncentracija 400 nM);
- Sterilna, deoinizirana voda 3,95 µL;
- $cDNA 1 \mu L$.

Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 12,5 µL. Reakcijski uvjeti bili su sljedeći:

- 95°C 5 minuta
- $95^{\circ}C 30$ sekundi
- 59°C 30 sekundi 32 ciklusa
- 72°C 30 sekundi –
- 72°C 7 minuta
- 4°C neograničeno

Produkti reakcije umnažanja analizirani su u 2% gelu agaroze.

3.2.10. Probir transkripata korištenjem pločica TaqMan Gene Expression Array Plates

Za pregled ispoljavanja većeg broja gena ključnih za proliferaciju/stanični ciklus, korištene su komercijalno dostupne TaqMan pločice "TaqMan Gene Expression Array Plates". Specifično, korištene su pločice "TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulation" koje su u sebi sadržavale probe i početnice za 44 gena od interesa i četiri referentna gena. Prije korištenja, pločice su centrifugirane kako bi se njihov sadržaj spustio na dno jažica. U svaku jažicu stavljena je reakcijska smjesa koja je sadržavala:

- 10 µL "TaqMan Fast Advanced Master Mix";
- 8,5 µL sterilne, deionizirane vode;
- 1,5 µL cDNA;

Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20 µL. Nakon što su reakcijske smjese otpipetirane, pločice su pokrivene prozirnom folijom "MicroAmp Optical Adhesive Film", kratko

vorteksirane kako bi se sadržaj svake jažice pomiješao s probom i početnicama te centrifugirane kako bi se sadržaj spustio na dno jažica. Reakcija je izvedena korištenjem instrumenta, "7300 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems, SAD) u uvjetima koje je naveo proizvođač:

- $50^{\circ}\text{C} 2$ minute
- $95^{\circ}C 2$ minute
- $95^{\circ}C 15$ sekundi 40 ciklusa
- $60^{\circ}\text{C} 60 \text{ sekundi}$

Relativna promjena razine transkripta ciljnih gena izračunata je metodom delta delta Ct (2^{$-\Delta\Delta$ Ct}).

3.2.11. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Za preciznu relativnu kvantifikaciju ciljnih transkripata korištena je lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu. Reakcija su izvedne korištenjem instrumenta "7300 Real-Time PCR System", u pločicama s 96 jažica "MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate". Svaka reakcijska smjesa sadržavala je:

- 10 µL "PowerUp SYBR™ Green Master Mix";
- 1 μL pomiješanih "forward" i "reverse" početnica (koncentracija svake 5 μM; konačna koncentracija u smjesi 250 nM);
- 7,5 µL sterilne, deionizirane vode;
- 1,5 µL cDNA.

Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 20 µL. Uvjeti umnažanja:

- $50^{\circ}C 2$ minute
- $95^{\circ}C 5$ minuta
- $95^{\circ}C 15$ sekundi
- 60° C 15 sekundi 40 ciklusa
- $72^{\circ}C 1$ minuta

Svaka reakcija rađena je u tehničkom triplikatu. Relativna promjena razine transkripta ciljnih gena izračunata je metodom delta delta Ct $(2^{-\Delta\Delta Ct})$.

3.2.12. Izdvajanje ukupnih proteina i proteina jezgre/citoplazme

3.2.12.1. Ukupni proteini

Za izdvajanje ukupnih proteina te proteina citoplazme i jezgre stanice su nasađene u bočice površine 25 cm² s ventiliranim čepom, u 5 mL medija. Uzgajane su ustanovljenim eksperimentalnim uvjetima. Za izdvajanje ukupnih proteina korišten je "RIPA Lysis and Extraction Buffer" uz dodatak inhibitora proteaza "cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail". Ukratko, stanicama je uklonjen medij i dva puta su isprane hladnim puferom PBS (od engl. Phosphate-Buffered Saline). Nakon ispiranja, stanicama je dodano 350 μ L hladnog pufera RIPA i inkubirane su na ledu tijekom pet minuta uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije, lizat stanica skupljen je strugalicom, prebačen u mikroepruvetu od 1,5 mL i centrifugiran 15 minuta na 14 000 x g, na 4°C. Nakon centrifugiranja, supernatant koji je sadržavao proteine prebačen je u novu mikroepruvetu i pohranjen na -80°C do daljnje uporabe.

3.2.12.2. Proteini citoplazme i jezgre

Za izdvajanje proteina citoplazme i jezgre korišten je "NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents" uz dodatak inhibitora proteaza "cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail". Ukratko, stanice su odvojene od podloge otopinom 0.25% (w/v) Tripsin-0.53 mM EDTA, a potom je, za neutralizaciju tripsina, stanicama dodan svježi medij DMEM s 10% FCS. Stanice su centrifugirane pet minuta na 500 x g i resuspendirane u 1 mL hladnog PBS. Potom su prebačene u mikroepruvetu i centrifugirane tri minute na 500 x g, na 4°C. Supernatant je odvojen pipetom i stanicama je dodan reagens CER I, u volumenu koji je ovisio o volumenu taloga (proizvođač navodi preporučeni volumen). Talog je resuspendiran vorteksiranjem tijekom 15 sekundi, a potom je uzorak inkubiran na ledu tijekom 10 minuta. Nakon inkubacije je dodan reagens CER II, uzorak je vorteksiran pet sekundi i ostavljen jednu minutu na ledu, ponovo vorteksiran pet sekundi i centrifugiran pet minuta na 16 000 x g i na 4°C. Supernatant koji je sadržavao proteine citoplazme prebačen je u novu mikroepruvetu i pohranjen na -80°C. Pelet koji je ostao resuspendiran je u hladnom reagensu NER i vorteksiran 15 sekundi. Uzorak je stavljen na led tijekom deset minuta. Vorteksiranje i inkubacija na ledu ponovljeni su još četiri puta, a potom je uzorak centrifugiran 10 minuta na 16 000 x g i na 4°C. Supernatant koji je sadržavao proteine jezgre prebačen je u novu mikroepruvetu i pohranjen na -80°C.

3.2.13. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijom, metodom po Bradfordu [230]. Za određivanje koncentracije proteina korišten je "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 450 ml". Po pet mikrolitara uzorka naneseno je u pojedine jažice u pločicama s 96 jažica. Paralelno s uzorcima, u zasebne su jažice naneseni uzorci BSA otopljeni u PBS, točno određene koncentracije. Potom je dodano 200 µL reagensa Bradford i pločica je inkubirana na sobnoj temperaturi pet minuta. Nakon toga, izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini 620 nm korištenjem instrumenta "EZ Read 2000 Microplate Reader". Koncentracija proteina određena je pomoću baždranog pravca koji se izvede mjerenjem apsorbancije prethodno spomenutih uzoraka BSA u PBS. Izračunat je volumen uzorka potreban za pohranu točno određene količine proteina, za daljnje analize. Uzorci su pomiješani s odgovarajućim volumenom pufera PBS i puferom Laemmli, te zagrijani pet minuta na temperaturu od 95°C pri kojoj dolazi do ireverzibilne denaturacije proteina.

3.2.14. Analiza proteina metodom Western blot

Proteini su razdvojeni elektroforezom u diskontinuiranom denaturirajućem gelu poliakrilamida koji se sastojao od 5% sabijajućeg gela i 10% razdvajajućeg gela. U svaku jažicu gela nanesena je unaprijed određena količina proteina: 14 µg za ukupne proteine i proteine citoplazme te 8 µg za proteine jezgre. Napon korišten za elektroforezu iznosio je 90 volti. Elektroforeza je trajala sve dok boja bromofenolno modrilo iz uzoraka nije došla do donjeg ruba gela. Nakon elektroforeze, proteini su preneseni na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm "Roti-NC, transfer membrane". Transfer proteina izvršen je korištenjem instrumenta "Trans-Blot Turbo Transfer System" (Bio-Rad Laboratories, SAD). Transfer je trajao 10 minuta pri stalnoj jačini struje od 1,3 ampera. Nakon transfera, membrane su obojane 0,1% otopinom Ponceau S u octenoj kiselini kako bi se odredila uspješnost prijenosa na membranu, Višak otopine na membrani ispran je destiliranom vodom, a membrane su skenirane za potrebe daljenje analize.

Membrane su potom blokirane u 5% otopini nemasnog mlijeka, u puferu TBST. Nakon blokiranja, inkubirane su s otopinom primarnog protutijela preko noći, na 4°C, uz stalno miješanje. Isprane su tri puta puferom TBST po pet minuta te inkubirane jedan sat s otopinom sekundarnog protutijela. Nastali kompleksi antigen – primarno protutijelo – sekundarno protutijelo vizualizirani su pomoću "SuperSignal[™] West Pico PLUS Chemiluminescent

Substrate" korištenjem instrumenta "Alliance Q9 Mini" (Uvitec Ltd, Ujedinjeno Kraljevstvo). Vrpce ciljnih proteina kvantificirane su denzitometrijom korištenjem programa "ImageJ" (National Institutes of Health, SAD). Za normalizaciju signala korišten je signal "housekeeper" protein i signal ukupnih proteina obojenih bojom Ponceau S.

3.2.15. Imunofluorescencija – H3K27me3

Prije nasađivanja stanica, pokrovna stakalca su sterilizirana potapanjem u 70% etanol i zračenjem UV-svijetlom tijekom pola sata. Nakon toga, stakalca su smještena u pločice s 24 jažice i u njih su nasađene stanice. U svaku jažicu nasađeno je 30 000 stanica u jednom mililitru medija. Nakon uzgoja u prethodno definiranim eksperimentalnim uvjetima, stanicama je uklonjen medij i dodano je 600 µL otopine za fiksaciju (4% otopina paraformaldehida). Stanice su fiksirane 15 minuta na sobnoj temperaturi, otopina za fiksaciju je uklonjena, a stakalca na kojima se nalaze fiksirane stanice isprana su tri puta s PBS, svaki puta u trajanju od pet minuta. Nakon ispiranja, stakalca su stavljena u otopinu za blokiranje tijekom jednog sata, na sobnoj temperaturi, a nakon toga u otopinu primarnog protutijela "Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) Rabbit mAb #9733".

Stakalca su inkubirana s primarnim protutijelom preko noći na +4°C. Sljedeći dan su isprana puferom PBS tri puta po pet minuta, a potom inkubirana s otopinom sekundarnog protutijela "Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')2 Fragment (Alexa Fluor 488 Conjugate) #4412", isprana su tri puta u puferu PBS po pet minuta, a potom im je dodana otopina boje DAPI u puferu PBS, koncentracija 1 μ g/mL. Inkubirana su pet minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Otopina DAPI isprana je dva puta u puferu PBS, po pet minuta. Na predmetna stakalca dodano je pet mikrolitara tekućine za uklapanje "ProLong Gold Antifade Reagent" i u tu su tekućinu stavljena stakalca sa stanicama. Stakalca su ostavljena u mraku na sobnoj temperaturi 24 sata, a potom su pohranjena na +4°C.

Fluorescencija protutijela i boje DAPI detektirana je na korištenjem mikroskopa "FLoid™ Cell Imaging Station" (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.2.16. Statistička obrada podataka

Svi pokusi rađeni su u, minimalno, biološkom duplikatu i tehničkom triplikatu. Podatci su statistički obrađeni u programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, SAD). Ukoliko nije naznačeno drugačije, podatci su analizirani kao skupina podataka jednosmjernom analizom

varijance (1 way ANOVA) s *post hoc* Dunnett ili Tukey testom. Vrijednost p < 0,05 smatrana je značajnom. Korištene oznake značajnosti: * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; **** $p \le 0,0001$

4. REZULTATI

4.1. Pregled svih dostupnih podataka: kombinirana primjena cisplatine i utišavanja/inhibiranja EZH2

Histon lizin metiltransferaza EZH2 jedan je od ključnih enzima koji uspostavljaju transkripcijski represivnu oznaku u području promotora brojnih gena. U skladu s time, neke istraživačke skupine su proučile djelovanje istovremenog utišavanja ili farmakološke inhibicije EZH2 i primjene cisplatine na stanice raka, *in vitro* i *in vivo*, s ciljem postizanja aditivnog ili sinergističkog učinka [231]. Pretraživanjem baze podataka PubMed, korištenjem ključnih riječi "EZH2" i "cisplatin", pronađene su 82 publikacije; u 27 istraživanja cisplatina je primijenjena u kombinaciji s utišavanjem ili inhibiranjem aktivnosti EZH2. Velik broj studija izveden je u uvjetima *in vitro*; u samo pet publikacija opisuju se učinci *in vivo*. Koncentracija cisplatine koja se upotrebljavala u pokusima *in vitro* bila je značajno različita u pojedinim studijama. Često su korištene koncentracije koje nisu ostvarive *in vivo*, i koje se, zbog toksičnost, ne smiju dati pacijentima.

Učinak kombinirane primjene istražen je u različitim modelima tumora, najčešće na stanicama podrijetlom od zloćudnih tumora jajnika ili pluća, za koje je cisplatina nerijetko lijek izbora. Ukupni broj i vrste modela istraživanja prikazani su na Slici 5. Metode inhibicije ili utišavanja EZH2 bile su raznolike. U većini istraživanja korišteno je utišavanje EZH2 sa shRNA ili siRNA, dok su se u manjem broju studija koristili selektivni (GSK126, EPZ011989, GSK343, tazemetostat) i neselektivni inhibitori EZH2 (DZNep). Načini utišavanja EZH2 u pojedinim studijama prikazani su na Slici 5, uz napomenu da je u nekim publikacijama korišteno nekoliko metoda inhibicije ili utišavanja.

U najvećem broju studija (24 od 27), inhibicija ili utišavanje EZH2 uz istovremenu primjenu cisplatine rezultiralo je aditivnim ili sinergističkim učinkom u odnosu na smanjenu vijabilnost i/ili proliferaciju stanica. U samo tri studije ova kombinacija imala je antagonistički učinak: na modelima stanica podrijetlom od zloćudnih tumora testisa, osteosarkoma i na jednom modelu stanica podrijetlom od zloćudnog tumora glave i vrata (nazofarinks, linije CNE and 8F) [232, 233, 234].



Broj studija u odnosu na podrijetlo zloćudno promijenjenih stanica



Ukupno=32

Slika 5. Studije kojima se istražio učinak istovremene primjene utišavanja i/ili inhibicije EZH2 i cisplatine. Na gornjoj slici prikazana je podjela studija s obzirom na podrijetlo stanica, a na donjoj su slici su prikazane korištene metode inhibicije ili utišavanja EZH2.

4.2. Pregled svih dostupnih podataka: kombinirana primjena cisplatine i utišavanja/inhibiranja KDM6A i KDM6B

Istovremena primjena cisplatine i inhibicije KDM6A i KDM6B je istražena u manjem broju studija, u odnosu na EZH2. Pretraživanjem baze PubMed, korištenjem kombinacija ključnih riječi: "KDM6A", "KDM6B", "UTX", "JMJD3", "GSK-J4" i "cisplatina", pronađeno je 11 znanstvenih radova. Od ovih 11 radova, u pet se istraživala primjena cisplatine uz utišavanje ili inhibiranje KDM6A i KDM6B. Istraživanja su provedena na stanicama osteosarkoma [233], karcinoma pluća nemalih stanica [235], raku zametnih stanica testisa [232], hondrosarkomu [236] i raku jajnika [237].

U svim se istraživanjima, osim u istraživanju na stanicama raka jajnika [237], koristio spoj GSK-J4 i/ili utišavanje metodom shRNA, kako bi se poništilo djelovanje oba enzima; i KDM6A, i KDM6B. Ovim istraživanjima pokazano je da utišavanje ili inhibicija KDM6A/KDM6B povećava osjetljivost stanica raka na cisplatinu, te da kombinacija cisplatine i GSK-J4 ima aditivni/sinergistički učinak u odnosu na smanjenje proliferacije i/ili vijabilnosti stanica. Studijom provedenom na stanicama raka jajnika pokazan je antagonistički učinak selektivnog utišavanja siRNA-KDM6B na citotoksični učinak cisplatine. Međutim, važno je naglasiti da u ovom istraživanju nije bio utišan enzim KDM6A koji također može ukloniti metilne skupine s H3K27me3.

4.3. Uspostavljanje eksperimentalnih uvjeta

Dva stanična parametra korištena su za uspostavljanje eksperimentalnih uvjeta, kako bi se odredile koncentracije i vrijeme izlaganja spojevima u daljnjem radu: vijabilnost i proliferacija. Prilikom odabira koncentracije i duljine izlaganja spojevima odlučeno je da će se koristiti oni uvjeti koji imaju prvenstveno modulatoran učinak u vidu blagog smanjenja vijabilnosti i/ili smanjenja proliferacije stanica (IC₁₅ - IC₃₀; *od engl*. Inhibitory Concentration).

4.3.1. Vijabilnost stanica u odnosu na koncentraciju i vrijeme izlaganja cisplatini

Prvi spoj za koji su definirane koncentracija i vrijeme izlaganja bila je cisplatina. Mjerena je vijabilnost stanica uzgojenih u medijima "High i Low glucose", testom MTT nakon izlaganja cisplatini, u pet različitih koncentracija ($3 \mu M$ do $20 \mu M$). Vrijeme izlaganja bilo je 24 i 48 sati. Rezultati su prikazani na Slikama 6-8.



Slika 6. Vijabilnost stanica Detroit 562 nakon izlaganja različitim koncentracijama cisplatine tijekom 24 i 48 sati, u medijima s različitom koncentracijom glukoze. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 7. Vijabilnost stanica FaDu nakon izlaganja različitim koncentracijama cisplatine tijekom 24 i 48 sati, u medijima s različitom koncentracijom glukoze. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 8. Vijabilnost stanica HT-29 nakon izlaganja različitim koncentracijama cisplatine tijekom 24 i 48 sati, u medijima s različitom koncentracijom glukoze. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.

Nakon analize podataka odlučeno je da će se za daljnje pokuse stanice biti izložene 3 μ M cisplatini tijekom 48 sati. Ova koncentracija cisplatine pokazala je neznatan utjecaj na vijabilnost stanica. Stoga je procijenjeno da ovu koncentraciju cisplatine treba kombinirati s drugim spojevima.

4.3.2. Koncentracija tazemetostata

Nakon određivanja vremena izlaganja i koncentracije cisplatine, odredila se koncentracija tazemetostata koja će se koristiti u daljnjem istraživanju. Kako bi se povećala osjetljivost stanica na djelovanje cisplatine, predviđeno je da stanice 24 sata prije i tijekom izlaganja cisplatini budu izložene tazemetostatu koji je bio otopljen u DMSO. Budući da je vremenski interval izlaganja cisplatini 48 sati, stanice su bile izložene tazemetostatu sveukupno 72 sata. Mjerena je vijabilnost stanica uzgajanih u medijima "High i Low glucose" testom MTT, nakon tretiranja s četiri različite koncentracija tazemetostata (5 µM do 20 µM). Kao kontrola otapala stanicama je dodan DMSO.

Niti jedna od ispitanih koncentracija nije imala značajan utjecaj na vijabilnost stanica, niti nakon izlaganja u trajanju od 72 sata, neovisno o razini glukoze u mediju. Odlučeno je, na temelju prethodnih iskustava i istraživačkog rada, da se u istraživanju koristi 10 μ M tazemetostat.

4.3.3. Vijabilnost stanica nakon izlaganja cisplatini i tazemetostatu

Nakon određivanja optimalnog vremenskog intervala i koncentracija individualnih spojeva, cisplatine i tazemetostata, u odnosu na vijabilnost stanica, istražen je učinak njihove istovremene primjene u medijima "High i Low glucose". Pokusi su postavljeni moduliranjem šest eksperimentalnih uvjeta. Osim kontrolnog uvjeta, individualnih spojeva i njihove kombinacije, korišten je i DMSO kao "kontrola otapala", te kombinacija DMSO i cisplatine. Uspoređena je vijabilnost stanica u odnosu na kontrolne, netrertirane stanice.



Slika 9. Vijabilnost tri linije stanica nakon izlaganja različitim koncentracijama tazemetostata tijekom 72 sata, u medijima s različitom koncentracijom glukoze. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.


Slika 10. Vijabilnost stanica Detroit 562 nakon izlaganja individualnim spojevima i njihovim kombinacijama, u medijima s različitom koncentracijom glukoze. Ukupno vrijeme izlaganja: 72 sata. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 11. Vijabilnost stanica FaDu nakon izlaganja individualnim spojevima i njihovim kombinacijama, u medijima s različitom koncentracijom glukoze. Ukupno vrijeme izlaganja: 72 sata. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 12. Vijabilnost stanica HT-29 nakon izlaganja individualnim spojevima i njihovim kombinacijama u medijima s različitom koncentracijom glukoze. Ukupno vrijeme izlaganja: 72 sata. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 13. Usporedba vijabilnost sve tri linije stanica nakon izlaganja individualnim spojevima i njihovim kombinacijama u odnosu na koncentraciju glukoze u mediju. o mediju. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; **** $p \le 0,0001$.

Analizom dobivenih podataka pokazana je statistički značajna razlika između pojedinih uvjeta, ali ona – prema našoj procjeni, nije nužno biološki relevantna, u odnosu na koncentraciju

glukoze. Zbog toga su svi budući pokusi rađeni na stanicama uzgojenim samo u mediju s većom koncentracijom glukoze – "High glucose".

4.3.4. Proliferacija stanica nakon izlaganja cisplatini i tazemetostatu

Test MTT nije pokazao velike razlike u vijabilnosti stanica izloženih ispitivanim spojevima, iako su se pod mikroskopom mogle uočiti promjene u morfologiji stanica. Zbog toga smo se odlučili koristiti osjetljivi test proliferacije stanica u kojem se mjeri količina ugrađenog bromodeoksiuridina (BrdU) u molekulu DNA. Kao i u prethodnom pokusu, stanice su bile uzgajane u šest eksperimentalnih uvjeta. Osim kontrolnog uvjeta, individualnih spojeva i njihove kombinacije, korišten je i DMSO kao "kontrola otapala" te kombinacija DMSO i cisplatine.



BrdU HT29 High glucose - Cisplatina + tazemetostat



Slika 14. Proliferacija stanica nakon izlaganja individualnim spojevima i njihovim kombinacijama. Ukupno vrijeme izlaganja: 72 sata. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.

Za razliku od podataka dobivenim metodom MTT, mjerenje proliferacije pokazalo je znatne razlike u pojedinim eksperimentalnim uvjetima. U stanicama podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata (FaDu i Detroit 562) izlaganje cisplatini dovodi do značajnog smanjenja proliferacije, dok kombinacija cisplatine s otapalom DMSO ili tazemetostatom ne dovodi do dodatnih promjena. Za razliku od njih, cisplatina nije imala jednako snažan utjecaj na proliferaciju stanica HT-29, dok je kombinacija cisplatine s tazemetostatom dovela do značajnog povećanja proliferacije, samo u ovoj liniji stanica.

4.3.5. Koncentracija GSK-J4

Istovremena primjena cisplatine i tazemetostata nije rezultirala sinergističkim učinkom na proliferaciju stanica. Naprotiv, u stanicama HT-29 imala je antagonistički učinak. Budući da tazemetostat inhibira EZH2, i samim time postavljanje transkripcijski represivne oznake H3K27me3, postavilo se pitanje učinka spoja GSK-J4. Ovaj spoj, kao što je raspravljeno u uvodu, inhibira dva enzima, KDM6A i KDM6B, koji uklanjaju metilne skupine s H3K27me3 i kao takav djeluje kao antagonist tazemetostatu. Kako bismo odredili koncentraciju GSK-J4 koju ćemo koristiti u pokusima, stanice smo izložili različitim koncentracijama spoja, samostalno i u kombinaciji s 3 µM cisplatinom. Učinak smo odredili samo testom ugradnje BrdU, koji se, barem u našem modelu, pokazao puno osjetljivijim od testa MTT. Vremenski interval izlaganja stanica spoju GSK-J4 istovjetan je kao za spoj tazemetostat – 72 sata. U uvjetima u kojima je korištena kombinacija spojeva GSK-J4 i cisplatine, stanice su prvo izložene većem broju koncentracija GSK-J4 24 sata prije izlaganja cisplatini koje je trajalo 48 sati. Budući da je GSK-J4, kao i tazemetostat, otopljen u DMSO, koristili smo DMSO kao "kontrolu otapala". Rezultati za pojedine linije stanica prikazane su na slici 15.

Mjerenje proliferacije stanica pokazalo je da su stanice različito osjetljive na ovaj spoj. Najotpornijim su se pokazale stanice HT-29, Detroit 562 pokazao se umjereno osjetljivim, dok su FaDu stanice najosjetljivije na djelovanje GSK-J4. Zbog tog razloga za daljnje pokuse nije bilo moguće, niti praktično, koristiti jedinstvenu koncentraciju spoja GSK-J4 za sve tri linije stanica. Stoga je za buduće pokuse odlučeno koristiti individualne koncentracije GSK-J4 za pojedine linije stanica. Za Detroit 562 – 1 μ M; za FaDu – 0,5 μ M; za HT-29 – 2,5 μ M.



Slika 15. Proliferacija linija stanica nakon izlaganja spoju GSK-J4; samostalno ili u kombinaciji s cisplatinom. Ukupno vrijeme izlaganja: 72 sata. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.

4.3.6. Razina oznake H3K27me3

Metodom Western blot, kojom smo određivali razinu drugih proteina, nismo bili u mogućnosti odrediti razinu H3K27me3. Moguće je da se korišteno protutijelo nije moglo vezati za metilacijom modificrani odsječak denaturiranog proteina nakon pripreme uzorka. Zbog tog razloga odlučili smo provjeriti razinu H3K27me3 metodom imunofluorescencije.

	H3K27me3	DAPI	Prijeklop
Kontrola			
DMSO			
Tazemetostat			
GSK-J4			244 - 12 - 5 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 - 2
Cisplatina			
Cisplatina + DMSO			
Cisplatina + TZM		Van-	
Cisplatina + GSK-J4			

Imunofluorescencija H3K27me3 – Detroit 562

Slika 16. Imunofluorescencija H3K27me3 u stanicama Detroit 562.



Imunofluorescencija H3K27me3 - FaDu

Slika 17. Imunofluorescencija H3K27me3 u stanicama FaDu.

	H3K27me3	DAPI	Prijeklop
Kontrola			
DMSO			
Tazemetostat			
GSK-J4	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		
Cisplatina			and the second
Cisplatina + DMSO			
Cisplatina + TZM		No.	
Cisplatina + GSK-J4			

Imunofluorescencija H3K27me3 – HT-29

Slika 18. Imunofluorescencija H3K27me3 u stanicama HT-29.

4.3.7. Proliferacija stanica

Nakon određivanja koncentracija i vremenskih intervala izlaganja za sve spojeve koji će se koristiti u daljnjim pokusima, definirani su konačni eksperimentalni uvjeti. Za sve linije stanica koncentracija cisplatine iznosila je 3 μ M, koncentracija tazemetostata 10 μ M, dok je koncentracija GSK-J4 bila individualna za svaku liniju: 1 μ M za Detroit 562, 0,5 μ M za FaDu, 2,5 μ M za HT-29. Svi eksperimentalni uvjeti detaljno su opisani u poglavlju "Materijali i metode", u potpoglavlju 3.2.3. Poslije definiranja konačnih eksperimentalnih uvjeta izmjerena je proliferacija stanica. Rezultati su prikazani na slici 19.



Slika 19. Proliferacija svih linija stanica nakon izlaganja ispitivanim spojevima u definiranim eksperimentalnim uvjetima. *p $\leq 0,05$; **p $\leq 0,01$; ***p $\leq 0,001$; ****p $\leq 0,0001$; ns-nije statistički značajno

4.4. Stupanj apoptoze

Nakon što su određeni konačni eksperimentalni uvjeta na temelju rezultata testa vijabilnosti te proliferacije stanica, analizirali su se ostali staničnih parametri; apoptoza i stanični ciklus. Navedeni stanični parametri određeni su za sve linije stanica i sve definirane eksperimentalne uvjete.



Slika 20. Rezultati mjerenja apoptoze stanica Detroit 562, u definiranim eksperimentalnim uvjetima. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.

Eksperimentalni uvjeti	Žive stanice	Rana apoptoza	Kasna apoptoza	Mrtve stanice
Kontrola	$90,03 \pm 1,05$	$7,2 \pm 1,73$	$2,68 \pm 0,77$	$0,15 \pm 0,17$
DMSO	$90,28 \pm 1,28$	$7,35 \pm 1,73$	$2,30 \pm 0,57$	$0,\!08\pm0,\!10$
Tazemetostat 10 µM	$90,35 \pm 0,91$	6,58 ± 1,13	$3,05 \pm 0,69$	$0,\!08 \pm 0,\!05$
GSK-J4 1 µM	89,60 ± 2,20	$7,90 \pm 2,27$	$2,50 \pm 0,23$	$0,05 \pm 0,06$
Cisplatina 3 µM	85,28 ± 3,11	$10,13 \pm 2,23$	4,53 ± 0,85	$0,05 \pm 0,06$
Cisplatina + DMSO	85,63 ± 2,25	$10,10 \pm 1,87$	$4,28 \pm 0,57$	$0,05 \pm 0,06$
Cisplatina + TZM	86,78 ± 1,13	8,53 ± 1,01	$4,\!68 \pm 0,\!57$	$0,10 \pm 0,00$
Cisplatina + GSK-J4	$85,93 \pm 0,73$	$9,43 \pm 0,85$	4,60 ± 0,73	$0,05 \pm 0,06$

Tablica 5. Rezultati mjerenja apoptoze stanica Detroit 562 u svim eksperimentalnim uvjetima. Svi brojevi izraženi su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija postotka ukupnih stanica.

Rezultati mjerenja apoptoze stanica Detroit 562 u skladu su s rezultatima mjerenja vijabilnosti stanica testom MTT. U eksperimentalnim uvjetima bez cisplatine nije bilo značajnog citotoksičanog učinka. Stanice uzgajane u prisustvu cisplatine imaju povećani postotak stanica u kasnoj apoptozi. Kombinacija cisplatine s drugim spojevima nije imala dodatni učinak na apoptozu stanica.



Slika 21. Rezultati mjerenja apoptoze stanica FaDu u definiranim eksperimentalnim uvjetima. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.

Eksperimentalni uvjeti	Žive stanice	Rana apoptoza	Kasna apoptoza	Mrtve stanice
Kontrola	$89,48 \pm 1,57$	4,73 ± 0,78	$3,88 \pm 0,90$	$2 \pm 0,77$
DMSO	$90,25 \pm 1,42$	5,45 ± 0,44	$3,\!48 \pm 0,\!94$	$0,80 \pm 0,24$
Tazemetostat 10 µM	$89,58 \pm 1,34$	$5,18 \pm 0,56$	$4{,}58\pm0{,}57$	$0,\!68\pm0,\!57$
GSK-J4 0,5 μM	$89,93 \pm 1,16$	5,03 ± 0,56	$3,95 \pm 0,80$	$1,08 \pm 0,46$
Cisplatina 3 µM	$85,03\pm0,89$	$7,93 \pm 0,59$	$5{,}73\pm0{,}87$	$1,30 \pm 0,57$
Cisplatina + DMSO	$86,08 \pm 1,43$	$7,08 \pm 0,61$	$5,\!65 \pm 0,\!72$	$1,23 \pm 0,19$
Cisplatina + TZM	82,53 ± 3,28	8,03 ± 2,07	$7,95 \pm 1,71$	$1,53 \pm 0,56$
Cisplatina + GSK-J4	84,85 ± 1,35	$7,14 \pm 1,40$	$5,95 \pm 2,10$	$1,33 \pm 0,85$

Tablica 6. Rezultati mjerenja apoptoze stanica FaDu u svim eksperimentalnim uvjetima. Svi brojevi izraženi su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija postotka ukupnih stanica.

Rezultati mjerenja apoptoze stanica FaDu slažu se s rezultatima mjerenja vijabilnosti stanica testom MTT. Eksperimentalni uvjeti koji nisu uključivali cisplatinu nisu pokazali značajnu promjenu apoptoze u odnosu na kontrolni uvjet. Stanice uzgajane u prisustvu cisplatine imale većinom povećani postotak stanica u ranoj i kasnoj apoptozi. Najsnažniji učinak postignut je zajedničkom primjenom tazemetostata i cisplatine (rana apoptoza; p= 0,0028; kasna apoptoza: p= 0,0013). Kombinacija cisplatine s drugim spojevima nije imala dodatni učinak na razinu apoptoze stanica.



Slika 22. Rezultati mjerenja apoptoze stanica HT-29 u svim eksperimentalnim uvjetima. *p $\leq 0,05$; **p $\leq 0,01$; ***p $\leq 0,001$; ****p $\leq 0,0001$.

Eksperimentalni uvjeti	Žive stanice	Rana apoptoza	Kasna apoptoza	Mrtve stanice
Kontrola	$92,03 \pm 1,05$	$4,74 \pm 0,86$	$2,79 \pm 0,90$	$0,\!45 \pm 0,\!39$
DMSO	$94,\!01\pm0,\!74$	3,71 ± 0,62	$2,05 \pm 1,10$	$0,23 \pm 0,27$
Tazemetostat 10 µM	$91,\!30\pm0,\!49$	5,11 ± 1,35	3,21 ± 0,61	$0,\!38 \pm 0,\!40$
GSK-J4 2,5 μM	$92,16 \pm 1,60$	4,66 ± 0,41	$2,91 \pm 1,20$	$0,26 \pm 0,22$
Cisplatina 3 µM	87,78 ± 4,18	8,75 ± 1,28	3,88 ± 2,13	0,43 ± 0,39
Cisplatina + DMSO	$88,16 \pm 2,78$	8,06 ± 1,27	3,33 ± 1,24	$0,\!45 \pm 0,\!53$
Cisplatina + TZM	88,64 ± 2,66	$7,29 \pm 0,49$	3,43 ± 1,66	$0,\!64 \pm 0,\!78$
Cisplatina + GSK-J4	$89,39 \pm 0,39$	$6,80 \pm 0,73$	$3,44 \pm 0,25$	0,38 ± 0,27

Tablica 7. Rezultati mjerenja apoptoze stanica HT-29 u svim eksperimentalnim uvjetima. Svi brojevi izraženi su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija postotka ukupnih stanica.

Rezultati mjerenja apoptoze stanica HT-29 djelomično se slažu s rezultatima mjerenja vijabilnosti stanica testom MTT. Niti u jednom eksperimentalnom uvjetu nije zapažen statistički značajan pad postotka živih stanica , iako je vidljiv porast postotka stanica u ranoj apoptozi u uvjetima cisplatina (p=0,0002), cisplatina i DMSO (p= 0,0009), cisplatina i TZM (p=0,0142). Razlog ovome su nešto više standardne devijacije mjerenja u ovim uvjetima.

4.5. Faze staničnog ciklusa

Rezultati dobiveni mjerenjem vijabilnosti stanica i apoptoze bili su kompatibilni. Međutim, postojalo je nesuglasje između razine proliferacije stanica i apoptoze. Kako bi se dobio uvid u razloge koji su u pozadini nesuglasja, analizirao se i stanični ciklus. Ovo je bilo nužno za dodatno razumijevanje mehanizama djelovanja ispitivanih spojeva na stanice. U ovim mjerenjima, stanice su razvrstane u nekoliko skupina koje određuju odsječak staničnog ciklusa (fazu), ovisno o udjelu DNA u stanici: G0/G1, S, G2/M. Zbog rasapa stanica između faza S i G2/M nakon primjene cisplatine, prikazan je i zbroj postotaka stanica u ovim fazama (Slike 23-25; Tablice 8-10).



Slika 23. Detroit 562: Stanični ciklus u zadanim eksperimentalnim uvjetima. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; **** $p \le 0,0001$ (jednosmjerni test ANOVA; svi eksperimentalni uvjeti). $^{\Delta}p \le 0,05$; $^{\Delta\Delta}p \le 0,01$; $^{\Delta\Delta\Delta}p \le 0,001$; $^{\Delta\Delta\Delta\Delta}p \le 0,0001$ (jednosmjerni test ANOVA, samo eksperimentalni uvjeti koji uključuju cisplatinu).

Tablica 8. Rezultati određivanja faza staničnog ciklusa stanica Detroit 562 u svim eksperimentalnim uvjetima. Svi brojevi izraženi su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija postotka ukupnih stanica.

Eksperimentalni uvjeti	Faze G0/G1	Faza S	Faze G2/M	Faze S + G2/M
Kontrola	$40,78 \pm 2,54$	$26,38 \pm 0,50$	$30,2 \pm 1,78$	$56,58 \pm 2,14$
DMSO	43,03 ± 3,35	25,15 ± 1,59	$29,00 \pm 1,76$	54,15 ± 3,17
Tazemetostat 10 µM	45,73 ± 4,12	25,03 ± 2,25	26,48 ± 1,37	51,45 ± 3,57
GSK-J4 1 μM	$42,15 \pm 3,54$	$25,98 \pm 0,62$	28,90 ± 3,13	$54,88 \pm 3,74$
Cisplatina 3 µM	$7,93 \pm 0,81$	$39,90 \pm 8,67$	$48,05 \pm 11,68$	87,95 ± 3,01
Cisplatina + DMSO	$12,18 \pm 1,15$	35,68 ± 8,83	48,53 ± 9,13	$84,20 \pm 0,48$
Cisplatina + TZM	$17,73 \pm 0,10$	37,80 ± 5,32	$42,05 \pm 5,45$	$79,85 \pm 0,47$
Cisplatina + GSK-J4	9,33 ± 1,47	$40,38 \pm 7,83$	46,03 ± 8,53	86,40 ± 0,73

Analiza podataka vezanih uz stanični ciklus stanica Detroit 562 jednosmjernim testom ANOVA nije pokazala statistički značajne razlike između eksperimentalnih uvjeta, prvenstveno onih vezanih uz izlaganje cisplatini. Međutim, iz dobivenih grafova jasno se može uočiti da postoje određene razlike (faze G0/G1 i S+G2/M; Slika 23). Podatci su ponovno analizirani jednosmjernom analizom varijance, ali samo za eksperimentalne uvjete koji su uključivali cisplatinu (cisplatina, cisplatina + DMSO, cisplatina + tazemetostat, cisplatina + GSK-J4). Ova analiza pokazala je da postoje statistički značajne razlike između eksperimentalnih uvjeta koji uključuju cisplatinu. Statistički značajne razlike dobivene analizom dvije skupine podataka označene su drugim simbolima, zvjezdicama i trokutima. Isti postupak primijenjen je na podatcima vezanim uz stanični ciklus za liniju stanica FaDu (Slika 24).

Stanični ciklus FaDu - S faza



Eksperimentalni uvjeti



Slika 24. FaDu: stanični ciklus u zadanim eksperimentalnim uvjetima. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; **** $p \le 0,0001$ (jednosmjerni test ANOVA; svi eksperimentalni uvjeti). $^{\Delta}p \le 0,05$; $^{\Delta\Delta}p \le 0,01$; $^{\Delta\Delta\Delta}p \le 0,001$; $^{\Delta\Delta\Delta\Delta}p \le 0,0001$ (jednosmjerni test ANOVA; samo eksperimentalni uvjeti koji uključuju cisplatinu).

Eksperimentalni uvjeti	Faze G0/G1	Faza S	Faze G2/M	Faze S + G2/M
Kontrola	$50,90 \pm 3,72$	$25,88 \pm 1,60$	$21,38 \pm 2,58$	$47,25 \pm 4,15$
DMSO	54,35 ± 1,20	$24,83 \pm 0,98$	$19,28 \pm 1,00$	$44,10 \pm 1,33$
Tazemetostat 10 µM	$59,00 \pm 4,87$	$22,23 \pm 2,61$	$16,95 \pm 2,26$	$39,18 \pm 4,48$
GSK-J4 0,5 μM	$50,18 \pm 1,90$	$26,88 \pm 0,97$	$21,03 \pm 1,38$	$47,90 \pm 2,35$
Cisplatina 3 µM	6,18 ± 2,48	$51,98 \pm 6,71$	$38,28 \pm 6,63$	$90,25 \pm 0,25$
Cisplatina + DMSO	$7,30 \pm 2,32$	$35,83 \pm 8,89$	$52,\!40 \pm 7,\!95$	$88,23 \pm 0,97$
Cisplatina + TZM	$10,83 \pm 1,59$	$35,95 \pm 9,96$	$49,68 \pm 9,12$	85,63 ± 0,92
Cisplatina + GSK-J4	$6,\!45 \pm 2,\!65$	$51,78 \pm 3,50$	$38,65 \pm 4,03$	$90,43 \pm 0,69$

Tablica 9. Rezultati određivanja faza staničnog ciklusa stanica FaDu u svim eksperimentalnim uvjetima. Svi brojevi izraženi su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija postotka ukupnih stanica.

Stanični ciklus HT-29 - G0/G1 faze





Slika 25. HT-29: stanični ciklus u zadanim eksperimentalnim uvjetima. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; **** $p \le 0,0001$.

Tablica 10. Rezultati određivanja faza staničnog ciklusa stanica HT-29 u svim eksperimentalnim uvjetima. Svi brojevi izraženi su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija postotka ukupnih stanica.

Eksperimentalni uvjeti	Faze G0/G1	Faza S	Faze G2/M	Faze S + G2/M
Kontrola	$55,88 \pm 3,16$	$25,70 \pm 1,63$	$17,13 \pm 2,63$	$42,83 \pm 4,18$
DMSO	$57,58 \pm 1,77$	$24,23 \pm 0,93$	$17,25 \pm 1,84$	$41,\!48 \pm 2,\!67$
Tazemetostat 10 µM	$55,80 \pm 1,82$	$25,93 \pm 1,20$	$16,88 \pm 0,77$	$42,80 \pm 0,94$
GSK-J4 2,5 μM	$58,68 \pm 2,87$	$23,78 \pm 1,44$	$16,13 \pm 2,71$	$39,90 \pm 4,03$
Cisplatina 3 µM	$34,05 \pm 5,66$	$22,93 \pm 0,85$	$39,95 \pm 3,82$	$62,88 \pm 3,05$
Cisplatina + DMSO	$44,15 \pm 1,81$	$23,75 \pm 3,47$	$30,05 \pm 3,07$	$53,80 \pm 0,62$
Cisplatina + TZM	$43,05 \pm 1,43$	$26,23 \pm 2,54$	$28,38 \pm 1,69$	$54,60 \pm 1,44$
Cisplatina + GSK-J4	$35,63 \pm 4,09$	$25,23 \pm 4,25$	$36,68 \pm 6,09$	$61,90 \pm 1,90$

4.6. Izdvajanje i pročišćavanje ukupne RNA i obrnuto prepisivanje

Nakon što smo odredili sve stanične parametre; vijabilnost, proliferaciju, apoptozu i stanični ciklus, odlučili smo istražiti molekularno-genetičku osnovu opaženih promjena. Prvi korak u tome bio je određivanje aktivnosti gena od interesa kvantifikacijom njihovih transkripata. Za izdvajanje ukupne RNA korišten je TRIzol. Nakon izdvajanja, koncentracija i čistoća RNA određena je spektrofotometrijom, mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama 230, 260 i 280 nm. U Tablici 11. prikazani su reprezentativni podatci za stanice Detroit 562.

Eksperimentalni uvjeti	Koncentracija (ng/µL)	Volumen dodane vode (µL)	A260/280	A260/230
Kontrola	452,45	60	1,97	2,31
DMSO	415,55	60	1,98	2,32
Tazemetostat	379,19	70	1,97	2,35
GSK-J4	501,10	40	2,01	2,29
Cisplatina	466,49	50	2,00	2,33
Cisplatina + DMSO	427,44	50	1,99	2,36
Cisplatina + TZM	410,42	50	1,98	2,34
Cisplatina + GSK-J4	728,32	30	2,04	2,26

Tablica 11. Podatci spektrofotometrijskog mjerenja ukupne RNA jednog biološkog replikata stanica Detroit 562.

Koncentracija izdvojene ukupne RNA mijenjala se zbog utjecaja eksperimentalnih uvjeta na aktivnost gena i zbog toga što je volumen sterilne, deionizirane vode u kojemu su uzorci otopljeni "proizvoljan", prema osobnoj procjeni. Izdvojena RNA koja je korištena u istraživanju morala je zadovoljiti kriterije čistoće, a to su omjer apsorbancije na valnim duljinama A260/280 (približno 2,00) te omjer apsorbancije na valnim duljinama A260/230 (približno 2,30).

Očuvanost izdvojene RNA provjerena je u 1% gelu agaroze. Glasnička RNA ne može se vidjeti u gelu agaroze. Stoga je njezina očuvanost procijenjena prema kvaliteti vrpci koje odgovaraju najzastupljenijoj vrsti RNA u uzorku – ribosomalnoj RNA; točnije, 28S i 18S rRNA. Jedino je RNA koja je imala dobro očuvanu ribosomalnu RNA korištena u reakciji obrnutog prepisivanja. Na slici 26. prikazani su uzorci izdvojene ukupne RNA.



Slika 26. Elektroforeza izdvojene ukupne RNA u 1% gelu agaroze. Linija 1: standard "Lambda DNA/HindIII Marker". Linije 2 – 7: reprezentativni uzorci izdvojene ukupne RNA različitih koncentracija. Očuvanost ribosomalne RNA u ovim uzorcima je zadovoljavajuće razine. U uzorcima 5 i 7 može se vidjeti zaostala genomska DNA.

U nekim uzorcima izdvojene RNA mogla se uočiti genomska DNA, koja je bila nepoželjna. Kontaminirajuća genomska DNA uklonjenja je iz uzoraka korišenjem kompleta kemikalija "gDNA Removal kit". Kako bismo se uvjerili da je genomska DNA zaista uklonjena, pročišćena RNA korištena je kao kalup u lančanoj reakciji polimerazom uz par početnica GAPDH 2 i 3. Početnica GAPDH 2 smještena je u eksonu gena GAPDH, dok je početnica GAPDH 3 smještena u intronu istog gena. U slučaju prisustva genomske DNA u uzorku ovim parom početnica umnožit će se odsječak veličine 644 parova baza (pb). Nakon pročišćavanja RNA i PCR u 2% gelu agaroze nisu uočeni odsječci (amplikoni) koji bi mogli nastati zbog umnažanja genomske DNA (Slika 27.)



Slika 27. Provjera prisustva kontaminirajuće genomske DNA u uzorcima, nakon pročišćavanja i reakcije umnažanja. Linija 1: standard "100 bp DNA Ladder"; linije 2-9 uzorci RNA nakon pročišćavanja, linija 10: genomska DNA - pozitivna kontrola.

Nakon provjera kvalitete i čistoće ukupne RNA, jedan mikrogram je korišten u reakciji obrnutog prepisivanja. Kako bi se provjerila uspješnost obrnutog prepisivanja, nastala cDNA korištena je kao kalup u reakciji PCR s početnicama GAPDH 1 i 2, koje su smještene u eksonima visoko ispoljenog gena GAPDH ("housekeeping" gen). U slučaju da je reakcija obrnutog prepisivanja uspjela, ovim će se početnicama umnožiti odsječak veličine 600 parova baza (Slika 28).



Slika 28. Provjere učinkovitosti obrnutog prepisivanja, PCR s početnicama GAPDH 1 i 2. Linija 1: standard "100 bp DNA Ladder", linije 2-8 reprezentativni uzorci.

4.7. Probir transkripata – pločice TaqMan

Kako bi se objasnili učinci ispitivanih spojeva na proliferaciju stanica, određena je razina transkripata većeg broja gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa. U tu svrhu odlučili smo koristiti pločice "TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulation". Ove pločice, s 96 jažica, sadrže početnice i probe za detekciju transkripata 48 gena; 44 ciljna gena i četiri "housekeeping" gena za normalizaciju, u duplikatu (Slika 29).



Slika 29. Pločica "TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulation"

Pokusi su napravljeni korištenjem cDNA dobivenih iz stanica Detroit 562 i HT-29, i to u četiri eksperimentalna uvjeta: 1. kontrola, 2. cisplatina, 3. cisplatina i tazemetostat te 4. cisplatina i GSK-J4. Nakon završenih reakcija, dobiveni rezultati upisani su u tablicu i odabrani su geni za koje su uočene promjene u razini transkripta koje bi potencijalno mogle objasniti uočene razlike u proliferaciji stanica u eksperimentalnim uvjetima. U Tablicama 12. i 13. navedeni su "sirovi" podatci za stanice HT-29.

Tablica 12. Registrirane vrijednosti Ct korištenjem pločice "TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulation"; linija HT-29.

Geni	Kontrola	Cisplatina	Cisplatina + TZM	Cisplatina + GSK-J4
18S	16,209	15,5616	16,0564	15,2141
GAPDH	18,2748	19,3231	19,4659	19,1601
HPRT1	23,8102	24,6315	24,2814	24,5665
GUSB	22,7714	23,376	23,2355	23,3655
ATM	27,4493	28,4211	29,1967	28,7799

ATR	25,3219	27,0242	27,1744	27,2171
CCNA1	37,8086	Neodređeno	36,7083	Neodređeno
CCNA2	24,0955	25,0555	25,3707	25,0856
CCNB1	22,0674	23,0742	23,1146	22,4928
CCNB2	22,2977	23,2407	23,371	23,5573
CCND1	24,2689	24,6875	24,5142	24,5557
CCND2	36,9331	Neodređeno	32,9468	Neodređeno
CCND3	24,9696	25,4736	25,6681	25,3096
CCNE1	24,4463	25,0124	24,9538	24,9764
CCNE2	26,1203	25,9372	25,5547	26,1769
CCNH	23,5742	24,9872	25,0479	25,1438
CDC2	23,1723	23,7838	24,0626	23,6202
CDC25A	24,6457	25,9372	26,1299	25,7245
CDK2	24,7964	24,8173	26,2219	25,8416
CDK4	21,8034	22,7594	22,9442	23,0018
CDK6	24,0274	24,6065	25,3871	24,6575
CDK7	24,4465	25,1812	25,7078	25,6538
CDKN1A	27,6	27,7667	27,4517	29,0014
CDKN1B	24,6055	25,4161	25,8851	25,1339
CDKN2A	20,1908	21,1282	21,6899	21,4596
CDKN2B	36,4952	36,2798	37,1857	38,0502
CDKN2C	27,6147	29,2227	28,3077	29,3491
CDKN2D	25,6768	26,7858	26,873	26,8964
E2F1	23,6222	24,712	24,9349	24,9942
E2F2	32,0213	32,5553	32,7859	33,0716
E2F3	25,0633	26,3945	27,1149	27,3042
E2F4	23,2325	24,5602	25,2817	24,7503
GSK3B	23,3561	24,7281	24,5133	24,1379
HDAC1	21,9891	22,4777	22,7711	22,826
HDAC2	23,7531	25,0543	24,8885	24,5304
HDAC3	24,9955	25,4744	26,3344	26,1399
HDAC4	30,2109	33,478	33,0746	32,6219
HDAC5	26,6376	28,2775	29,0151	29,4197
HDAC6	26,3558	27,8273	28,8209	29,0531
HDAC7	25,3628	26,4702	26,9502	26,9457
HDAC9	32,603	34,2168	33,0968	34,4197
PPP2CA	23,6636	24,6932	25,0775	24,8266
RAF1	28,5319	30,0464	30,6938	31,132
RB1	24,5455	25,9892	26,1957	27,2149
TGFB1	26,034	25,8544	23,5145	25,6777
TGFB2	26,7109	28,1774	28,1683	28,1698
TGFB3	29,2211	31,3396	31,5762	32,4511
TP53	23,2283	24,5854	24,72	24,6038

Tablica 13. Izračun promjene transkripcijske aktivnosti ("fold change") u stanicama HT-29, metodom izračuna delta delta Ct – pločice TaqMan.

Geni	Cisplatina	Cisplatina + TZM	Cisplatina + GSK-J4
ATM	-1,290	-2,434	-1,666
ATR	-2,140	-2,618	-2,464
CCNA1	Neodređeno	2,958	Neodređeno
CCNA2	-1,279	-1,755	-1,316
CCNB1	-1,322	-1,498	1,124
CCNB2	-1,264	-1,525	-1,586
CCND1	1,138	1,164	1,237
CCND2	Neodređeno	21,863	Neodređeno
CCND3	1,072	-1,176	1,193
CCNE1	1,027	-1,031	1,045
CCNE2	1,726	2,042	1,451
CCNH	-1,751	-2,013	-1,966
CDC2	-1,005	-1,344	1,107
CDC25A	-1,610	-2,028	-1,399
CDK2	1,499	-1,947	-1,367
CDK4	-1,276	-1,598	-1,520
CDK6	1,018	-1,860	-1,025
CDK7	-1,094	-1,738	-1,530
CDKN1A	1,355	1,529	-1,750
CDKN1B	-1,153	-1,760	1,047
CDKN2A	-1,259	-2,049	-1,596
CDKN2B	1,765	-1,170	-1,947
CDKN2C	-2,005	-1,172	-2,204
CDKN2D	-1,419	-1,661	-1,543
E2F1	-1,400	-1,801	-1,715
E2F2	1,050	-1,232	-1,372
E2F3	-1,655	-3,005	-3,131
E2F4	-1,651	-3,000	-1,897
GSK3B	-1,702	-1,617	-1,139
HDAC1	1,084	-1,247	-1,183
HDAC2	-1,621	-1,593	-1,135
HDAC3	1,091	-1,834	-1,464
HDAC4	-6,331	-5,277	-3,523
HDAC5	-2,050	-3,767	-4,557
HDAC6	-1,824	-4,003	-4,297
HDAC7	-1,417	-2,178	-1,985
HDAC9	-2,013	-1,021	-2,334
PPP2CA	-1,343	-1,932	-1,483

RAF1	-1,879	-3,244	-4,017
RB1	-1,789	-2,275	-4,214
TGFB1	1,722	7,910	1,932
TGFB2	-1,817	-1,991	-1,821
TGFB3	-2,856	-3,709	-6,216
TP53	-1,685	-2,039	-1,719

Na temelju dobivenih rezultata odlučili smo se detaljnije analizirati transkripciju nekoliko odabranih gena, na temelju promjene transkripcijske aktivnosti i/ili uloge koju bi proteinski produkt mogao imati u nastanku opaženih fenomena: CDKN2C (P18), CDKN2A (P19), CDKN1A (P21), CCND2 (ciklin D2), CDK2 (ciklin ovisna kinaza 2) i TGFB1 (transformirajući čimbenik rasta beta 1). Uz ove gene, analizirana je i razina transkripata gena EZH2 i KDM6B (JMJD3) koji se ne nalaze na popisu gena u pločici TaqMan ali je aktivnost njihovih proteinskih produkata izravno inhibirana tazemetostatom i GSK-J4.

Nakon određivanja gena od interesa, konstruirali smo početnice specifične za odabrane gene, koje smo koristili u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Početnice su konstruirane na način da se barem jedna od početnica, ukoliko je moguće, nalazi na spoju dva eksona. Početnice su također smještene na dijelovima transkripta koji su zajednički svim transkripcijskim inačicama ciljnog gena, u slučaju da postoji više od jedne potvrđene transkripcijske inačice u bazi podataka GeneBank. Veličina umnoženog odsječka nužno je bila veća od 70 i manja od 200 parova baza. Početnice EZH2 prethodno su konstruirane, za potrebe prethodnog istraživanja.

Specifičnost vezanja početnica provjerena je konvencionalnom reakcijom "end-point" PCR, na cDNA uzorka kontrola stanica HT-29. Produkti reakcije analizirani su elektroforezom u 2% gelu agaroze. Na Slici 30. su specifični produkti PCR reakcije s odabranim početnicama za ranije navedene gene.



Slika 30. Odsječci PCR u 2% gelu agaroze. Linija 1: standard "100 bp DNA Ladder"; linije: 2 do 7 - odječci dobiveni umnažanjem početnicamas za gene: *P18*, *P19*, *P21*, *TGFB1*, *CDK2*, *CCND2*.

4.8. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Razina transkripata određena je metodom RT-qPCR, korištenjem SYBR Green kemije. Razina transkripata izražena je kao relativna promjena u odnosu prema kontrolnom eksperimentalnom uvjetu, u kojem je razina transkripata uvijek bila jedan. Za određivanje relativne promjene korišten je izračun delta delta Ct $(2^{-\Delta\Delta Ct})$.



Slika 31. RT-qPCR: Razina transkripata gena *CDKN2C (P18).* * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.



Slika 32. RT-qPCR: Razina transkripata gena *CDKN2A (P19).* * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.



Slika 33. RT-qPCR: Razina transkripata gena *CDKN1A (P21).* *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001.



Slika 34. RT-qPCR: Razina transkripata gena *CDK2*. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.



Slika 35. RT-qPCR: Razina transkripata gena *CCND2*. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.



Slika 36. RT-qPCR: Razina transkripata gena *TGFB1*. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.



Slika 37. RT-qPCR: Razina transkripata gena *EZH2*. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.



Slika 38. RT-qPCR Razina transkripata gena *KDM6B*. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$.

4.9. Analiza proteina - Western blot

Nakon određivanja promjene razine transkripata ciljnih gena, istraženo je: da li je promjena u razini transkripata praćena promjenom razine proteina. Budući da je RT-qPCR izrazito osjetljiva metoda, odlučili smo da gene, čija je promjena aktivnosti (mjerena količinom transkripta) bila manja od dva puta (povećana ili smanjena), nećemo istražiti na razini proteina. U skladu s time, proteinski produkti gena *CDKN2C (P18), CDKN2A (P19)* i *CDK2* nisu bili obuhvaćeni daljnjim analizama. Geni od interesa, *TGFB1, CCND2* i *CDKN1A*, pokazali su značajnu promjenu razine transkripta u pojedinim eksperimentalnim uvjetima i, sukladno tome, odredili smo razinu njihovih proteinskih produkata. Razina proteina P53 istražena je budući da je čimbenik transkripcije; snažan regulator transkripcije gena *CDKN1A*. Proteini EZH2 i

KDM6B obuhvaćeni su analizom zbog toga što je njihova aktivnost meta primijenjenih inhibitora, tazemetostata (EZH2) i GSK-J4 (KDM6B). Također, plan istraživanja nužno je morao uključiti i određivanje sveukupne razine posttranslacijske modifikacije H3K27me3.

Analizom Western blot određeni su proteini od interesa u uzorcima izdvojenih ukupnih proteina, te proteina citoplazme i jezgre. Na slikama 39 – 56 prikazani su dobiveni rezultati. Na svakoj slici prikazani su reprezentativni primjeri dobivenih vrpci, pripadajući "housekeeping" proteini i ukupni proteini obojani bojom Ponceau S. Dobiveni signali analizirani su denzitometrijom, korištenjem računalnog programa "ImageJ". Rezultati analize nalaze se pokraj slika; ali samo ako je jačina signala u svim uvjetima bila dovoljno jaka, što je omogućilo pouzdanu kvantifikaciju. U svim pokusima proteini su naneseni standardnim redosljedom, u odnosu na eksperimentalne uvjete:

- 1. Kontrola
- 2. DMSO
- 3. Tazemetostat
- 4. GSK-J4
- 5. Cisplatina
- 6. Cisplatina + DMSO
- 7. Cisplatina + tazemetostat
- 8. Cisplatina + GSK-J4



Western blot Detroit 562 - P21

Slika 39. Detroit 562: P21 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; *** $p \le 0,0001$.

Western blot FaDu - P21



Slika 40. FaDu: P21 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.
Western blot HT-29 - P21





Denzitometrija WB HT-29 proteini citoplazme - P21







Slika 41. HT-29: P21 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; *** $p \le 0,001$.



Western blot Detroit 562 – P53

Slika 42. Detroit 562: P53 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.





Slika 43. FaDu: P53 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 44. HT-29: P53 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.

Western blot HT-29 - P53

4.9.3. Protein ciklin D2



Western blot Detroit 562 – Ciklin D2



Slika 45. Detroit 562: Ciklin D2 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4.

Western blot FaDu – Ciklin D2



Slika 46. FaDu: Ciklin D2 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.

Western blot HT-29 – Ciklin D2







Slika 47. HT-29: Ciklin D2 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4.



Western blot Detroit 562 – TGF Beta

Slika 48. Detroit 562: TGFB1 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4.

Western blot FaDu – TGF Beta



Slika 49. FaDu: TGFB1 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4.

Western blot HT-29 – TGF Beta



Slika 50. HT-29: TGFB1 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4.



Western blot Detroit 562 – EZH2

Slika 51. Detroit 562: EZH2 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.



Slika 52. FaDu: EZH2 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$.

Western blot FaDu – EZH2



Western blot HT-29 – EZH2

Slika 53. HT-29: EZH2 - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,001.

Ukupni prot.



Western blot Detroit 562 – KDM6B



Denzitometrija WB Detroit 562 proteini citoplazme - KDM6B





Slika 54. Detroit 562: KDM6B - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; **** $p \le 0.0001$

Western blot FaDu – KDM6B



Slika 55. FaDu; KDM6B - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. *p $\leq 0,05$; **p $\leq 0,01$; ***p $\leq 0,001$; ****p $\leq 0,0001$ (jednosmjerni test ANOVA sa svim eksperimentalnim uvjetima). $^{\Delta}p \leq 0,05$; $^{\Delta\Delta}p \leq 0,01$; $^{\Delta\Delta\Delta}p \leq 0,001$; $^{\Delta\Delta\Delta\Delta}p \leq 0,0001$ (jednosmjerni test ANOVA bez eksperimentalnih uvjeta DMSO i GSK-J4).



Western blot HT-29 – KDM6B

Slika 56. HT-29: KDM6B - Western blot. 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4. * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** $p \le 0.001$; *** $p \le 0.001$:

5. RASPRAVA

Cisplatina je protutumorski lijek koji se koristi u liječenju različitih zloćudnih tumora. Učinkovitost ovog lijeka često je ograničena pojavom neosjetljivost ili ozbiljnih neželjenih pojava, zbog kojih se liječenja cisplatinom prekida. Također, za liječenje nekih vrste raka, na primjer raka debelog crijeva, cisplatina se ne koristi s obzirom na to da je iskustvo u klinici pokazalo da je ova vrsta raka otporna na cisplatinu zbog često prisutnih mutacija gena *TP53* i/ili zbog primarno nefunkcionalnih mehanizama uključenih u popravak oštećenja molekule DNA [238].

Uz "konvencionalne" protutumorske lijekove, u posljednjih 18 godina su u kliničkoj uporabi i spojevi koji moduliraju epigenom stanica. Epigenetičke promjene uključene su, izravno ili neizravno, u razvoj svih ključnih obilježja stanica raka. U skladu s time, pokazano je da primjena ovih spojeva može povećati osjetljivost stanica raka na druge protutumorske lijekove [239]. Prvi lijekovi, koji primarno moduliraju epigenom stanice: inhibitor DNA metiltransferaza (azacitidin) i inhibitor histon deacetilaza (vorinostat), odobreni su od strane FDA 2004., odnosno 2006. godine. Tijekom narednih godina sintetizirani su i istraženi novi spojevi koji djeluju na druge elemente koji čine epigenetički ustroj stanica [240]. Jedan od tih spojeva je i tazemetostat, inhibitor enzima EZH2 koji metilira lizin 27 u histonu H3. Tazemetostat je, za sada, odobren za liječenje dvije vrste zloćudnih oboljenja, epiteloidnih sarkoma i refraktornog folikularnog limfoma.

Cilj ovog doktorskog rada temelji se na istraživanju utjecaja istovremene primjene spojeva koji utječu na uspostavljanje ili uklanjanje transkripcijski represivne oznake (H3K27me3), tazemetostata i GSK-J4, u kombinaciji s cisplatinom, na stanice raka. Korišenjem modela karcinoma jednjaka pokazano je da učinak cisplatine ovisi o unutarstaničnoj razini glukoze [218], te da linije stanica raka jajnika koje su neosjetljive na cisplatinu imaju povećanu potrebu za glukozom [219, 220].

Stoga smo istražili utjecaj ovih spojeva uzgajanjem i tretiranjem stanica u dva medija koja su se razlikovala s obzirom na koncentraciju glukoze. Istraživanje je napravljeno na linijama stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata (Detroit 562 i FaDu) te zloćudnog tumora debelog crijeva (HT-29). Učinak odabranih spojeva je početno istražen funkcionalnim staničnim testovima, mjerenjem vijabilnosti i proliferacije stanica kao, i određivanjem postotka stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa i apoptoze. Opažene promjene su se,

istraživanjem na molekularno-genetičkoj razini, pokušale povezati s promjenama u ispoljavanju odabranih gena/proteina.

Iako postoji 27 znanstvenih publikacija u kojima je opisan utjecaj istovremene primjene cisplatine u kombinaciji sa spojevima koji inhibiraju/utišavaju EZH2, u samo tri studije je korišten tazemetostat. Također, samo u tri studije radilo se s linijama stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata, a niti jedna studija, očekivano, nije istraživala utjecaj ove kombinacije na modelu stanica podrijetlom od raka debelog crijeva (Slika 5). Kombinirana primjena GSK-J4 i cisplatine značajno je slabije istražena i ne postoje podatci dobiveni na modelima zloćudnih tumora podrijetlom od stanica glave i vrata i/ili debelog crijeva.

5.1. Uspostavljanje eksperimentalnih uvjeta i funkcionalni stanični testovi

Kako bismo uspostavili optimalne eksperimentalne uvjete, koristili smo testove kojima smo odredili vijabilnost i proliferaciju stanica nakon izlaganja različitim koncentracijama ispitivanih spojeva, u različitim vremenskim intervalima. Nakon ispitivanja djelovanja spojeva odlučili smo koristiti koncentracije spojeva koji su imali slabo izražen utjecaj na vijabilnost (IC5 - 15) i nešto jači učinak na proliferaciju stanica (IC5 - 75). S obzirom na to da je cilj ovog rada bio vezan uz istraživanje utjecaja kombinirane primjene spojeva, korištenjem ovakvih koncentracija spojeva ostavljen je prostor za uočavanje eventualnih aditivnih, sinergističkih ili antagonističkih učinaka. Ovo ne bi bilo moguće primijenom visoko citotoksičnih doza.

5.1.1. Uspostava eksperimentalnog modela na temelju mjerenja vijabilnosti stanica: cisplatina i tazemetostat

5.1.1.1. Cisplatina

Prvi spoj čiju smo koncentraciju i vrijeme izlaganja definirali bila je cisplatina. Vijabilnosti stanica je nakon izlaganja cisplatini primarno ovisila o podrijetlu stanica, a znatno slabiji utjecaj je imala koncentracija glukoze u mediju. Linije Detroit 562 i FaDu, podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata, pokazale su smanjenje vijabilnosti već nakon 24 sata. Nakon 48 sati izlaganja cisplatini učinak je bio puno izraženiji, pri čemu je već 15 μ M cisplatina dovela do 50% smanjenja vijabilnosti (Slike 6 i 7; p \leq 0,0001), u višoj koncentraciji glukoze. Stanice HT-29, podrijetlom od zloćudnog tumora debelog crijeva, pokazale su se značajno otpornijima. Ista koncentracija cisplatine (15 μ M) je nakon 48 sati dovela do smanjena vijabilnosti od samo 20% (Slika 8; p \leq 0,0001). Rezultati ovih pokusa dobro se slažu s

postojećim saznanjima o osjetljivosti pojedinih vrsta tumora na cisplatinu, što utječe i na odabir načina liječenja pojedinih zloćudnih oboljenja. Naime, cisplatina je sastavni dio protokola za liječenje raka glave i vrata [241], dok se za liječenje raka debelog crijeva cisplatina ne koristi. U indiciranim se slučajevima koristi njezin derivat, oksaliplatina [242].

Na temelju ovih eksperimenata, smo u daljnjem istraživanju sve tri linije stanica izlagali 3 μ M cisplatini, u trajanju od 48 sati. Ova koncentracija pokazala je minimalan ili zanemariv učinak na vijabilnost stanica *in vitro* (Slike 6-8.). U kliničkim je istraživanjima pokazano da koncentracija cisplatine u rasponu od 1-5 μ M ima terapijski učinak, pri čemu već i više terapijske koncentracije (4-5 μ M) mogu dovesti do teškog oštećenja bubrega [243]. Sljedeći korak bio je definirati način izlaganja stanica tazemetostatu.

5.1.1.2. Tazemetostat

Kako bismo istražili postojanje senzibilizirajućeg djelovanja tazemetostata, stanice smo izložili njegovom djelovanju tijekom 72 sata. Ovaj je vremenski interval odabran zbog toga što je poznato da se učinci tazemetostata pojavljuju nakon produljenog vremena izlaganja. Postoje istraživanja kojima je pokazano antiproliferativno i/ili citotoksično djelovanje tazemetostata nakon nekoliko dana inkubacije. Dobro je dokumentirano smanjene H3K27me3 nakon 72 sati izlaganja tazemetostatu [244]. Knutson i suradnici pratili su učinak tazemetostata nakon što su stanice izložili njegovom djelovanju tijekom dva do šest dana dana *in vitro* [200], a Brach i suradnici čak 28 dana [245].

Izlaganje stanica tazemetostatu nije pokazalo značajno smanjenje vijabilnosti u liniji stanica HT-29. Postojao je blagi učinak u odnosu na smanjenje vijabilnosti stanica Detroit 562 i FaDu u (FaDu High glucose 15 μ M (p=0,0191), FaDu Low glucose 20 μ M (p=0,0347); Detroit High glucose 15 μ M (p=0,0143) i 20 μ M (p=0,0111), Detroit Low glucose 15 μ M (p=0,0105) i 20 μ M (p=0,0002)) (Slika 9). Uzevši u obzir da niti jedna primjenjena koncentracija tazemetostata, neovisno o razini glukoze u mediju, nije rezultirala značajnim smanjenjem vijabilnosti, sve tri linije stanica smo u daljnjim pokusima izlagali 10 μ M tazemetostatu, tijekom 72 sata. U radu smo posebnu pozornost posvetili djelovanju otapala, DMSO, i to tako da smo u u svakoj analizi , uz netretirane, kontrolne stanice, uvodili i otapalom tretirane stanice ("solvent control"). U uspostavljanju eksperimentalnih uvjeta, korišten je volumni postotak DMSO koji je bio prisutan u pripravku s najvišom koncentracijom tazemetostata (0,4%).

5.1.1.3. Cisplatina i tazemetostat

Na temelju prethodnih rezultata, stanice su izložene 10 μ M tazemetostatu tijekom 24 sata kako bi se postigao senzibilizirajući učinak, dodana je cisplatina i pokus se nastavio tijekom narednih 48 sati (ukupna izloženost tazemetostatu – 72 sata). U ovim je pokusima volumni postotak DMSO ("solvent control") odgovarao njegovoj koncentraciji u 10 μ M tazemetostatu (0,2%).

Pregledom dostupne znanstvene literature u kojoj je opisano inhibiranje ili utišavanje EZH2 u kombinaciji s cisplatinom nismo našli usaglašen pristup (protokol) vezan uz kombiniranu primjenu utišavanja EZH2 i cisplatine; niti u odnosu na način i trajanje inhibiranja/utišavanja EZH2, niti u odnosu na primijenjenu koncentraciju ili trajanje izlaganje cisplatini. Načini na koje se pokušavala smanjiti aktivnost EZH2 su različiti: stabilno utišavanje sa shRNA, prolazno utišavanje sa siRNA ili korištenje selektivnih i neselektivnih farmakoloških inhibitora (Slika 5). Inhibitori su bili primijenjeni u različitim koncentracijama i različitim vremenskim intervalima; prije dodatka cisplatine, ili su primijenjeni istovremeno s cisplatinom. Također, koncentracija cisplatine značajno se razlikovala u pojednim studijama (od 0,1 do 3333 μM) [246].

Mjerenjem vijabilnosti su, nakon primijenjene kombinacije spojeva, pokazani neočekivani učinci. U liniji stanica Detroit 562, otapalo DMSO i tazemetostat imali su učinak. Došlo je do vrlo blagog, ali statistički značajnog pada vijabilnosti stanica u odnosu prema kontrolnom uvjetu, u mediju s višom koncentracijom glukoze (High glucose DMSO (p=0,0002), High glucose tazemetostat (p=0,0147)) (Slika 10). Opaženi učinak najvjerojatnije je posljedica djelovanja spoja DMSO, s obzirom na to da ne postoji statistički značajna razlika između vijabilnosti stanica izloženih DMSO i stanica izloženih tazemetostatu (p=0,4847). Još zanimljiviji učinci, u mediju "high glucose", mogu se uočiti u eksperimentalnim uvjetima koji su uključivali cisplatinu. Vidljivo je da cisplatina ima citotoksični učinak na stanice (~IC15), a istovremena primjena cisplatine i tazemetostat umanjuje citotoksični učinak cisplatine. Ovaj učinak ne može se objasniti djelovanjem otapala DMSO, s obzirom na to da postoji statistički značajna razlika između uvjeta: cisplatina + DMSO i cisplatina + TZM (p≤0,0001), a ne postoji razlika između uvjeta cisplatina + DMSO u odnosu prema samoj cisplatini (p=0,2327).

Učinak cisplatine, bilo samostalno ili u kombinaciji s DMSO ili tazemetostatom, primijećen je neovisno o razini glukoze u mediju. Važno je naglasiti da su sve opažene promjene u vijabilnosti stanica u ovoj skupini pokusa relativno male, vijabilnost je smanjena do 15%. Ove

razlike, iako statistički značajne zbog male standardne devijacije mjerenja, možda nemaju veliku biološku značajnost, u kontekstu cijelog biološkog sustava stanice. Primjena cisplatine na stanicama FaDu dovela je do približno 15% smanjenja vijabilnosti stanica u uvjetima visoke koncentracije glukoze u mediju, i približno 20% smanjenja u uvjetima niske koncentracije glukoze, u odnosu na kontrolni uvjet (Slika 11). Cisplatini dodani tazemetostat ili DMSO nisu doveli do dodatnih promjena u vijabilnosti.

U stanicama HT-29 (Slika 12) samostalna primjena tazemetostata povećala je vijabilnost stanica, u obje vrste medija, i u odnosu prema kontrolnom uvjetu, i u odnosu na DMSO (High glucose kontrola vs. TZM p=0,0042, DMSO vs. TZM p \leq 0,0001; Low glucose kontrola vs. TZM p=0,0224, DMSO vs. TZM p=0,0088). Dodatno, kombinacija tazemetostata i cisplatine u ovoj liniji stanica rezultira antagonističkim učinkom (High glucose cisplatina (99,29%) vs. cisplatina + TZM (106,24%), p=0,0251; Low glucose cisplatina (94,55%) vs. cisplatina + TZM (100,47%), p=0,027). S obzirom na male razlike u mjerenjima, učinak tazemetostata nije moguće odijeliti od učinaka koji su posljedica djelovanja otapala, DMSO.

U svim opisanim eksperimentima, stanice su uzgajane i tretirane u medijima s dvije različite koncentracije glukoze. Iako je i stanicama HT-29 postojao slabo izraženi učinak kombinacija cisplatina + DMSO i cisplatina + tazemetosta s obzirom na dostupnu glukozu (porast u mediju s nižom koncentracijom glukoze), zaključili smo da, iako razlike postoje, ne opravdavaju daljnje izvođenje pokusa u dva različita medija. Stoga smo odustali od uzgoja stanica u mediju s nižom razinom glukoze te je daljnje istraživanje napravljeno u mediju s višom razinom glukoze ("high glucose").

U ovim je pokusima kombinirana primjena tazemetostata i cisplatine ukazala na staničnospecifičan odgovor koji nismo očekivali. Dodavanje tazemetostata cisplatini je, u stanicama koje su osjetljive na cisplatinu smanjilo učinak cisplatine (Detroit 562) ili nije imalo učinka (FaDu) na vijabilnost stanica. Stanice neosjetljive na djelovanje cisplatine (HT-29) tazemetostat nije senzibilizirao.

Svakodnevnim promatranjem stanica pod mikroskopom uočene su morfološke promjene, u određenim eksperimentalnim uvjetima. Ove su promjene upućivale na značajan učinak spojeva, iako analiza vijabilnosti na to nije upućivala. Analiza metaboličke vijabilnosti, koju smo primjenjivali, temelji se na redukciji soli tetrazolija (MTT) u kristal formazan, u metabolički aktivnim stanicama. Razina redukcije ovisi o dehidrogenazama mitohondrija [247], primarno o sukcinat dehidrogenazi [248]. Nakon izlaganja stanica zračenju, Rai i

suradnici su primjetili da test vijabilnosti ne odražava promjene koje su primijetili mikroskopiranjem i brojenjem stanica koje su izložili zračenju u eksponencijalnoj fazi rasta. Istražili su podlogu fenomena i zaključili da stanica na izlaganje zračenju pokreće proces "obogaćenja" mitohondrija, zbog čega povećava broj aktivnih enzima koji reduciraju MTT. Razlike su bile drastične: smanjenje vijabilnosti od 20-30% u podlozi je imalo pad broja stanica u rasponu od 70-90% [249]. Godine 2019. Kleith i suradnici su dokazali da izlaganje stanica cisplatini dovodi do povećanja sadržaja mitohondrija ("mitochondrial content") [250]. Ovaj učinak cisplatine mogao bi biti razlog nesuglasju između opažnih morfoloških promjena i relativno malog pada vijabilnosti koju smo izmjerili testom MTT.

Zbog toga smo izmjerili proliferaciju stanica mjerenjem količine ugrađenog bromdeoksiuridina (BrdU) u molekulu DNA. Poznato je, a to smo pokazali i našim ranijim istraživanjima [251] da je ova metoda osjetljivija u odnosu test MTT [252]. Mjerenje proliferacije pokazalo je da ispitivani spojevi imaju vrlo snažan učinak na ovaj parametar (Slika 14).

5.1.2. Proliferacija stanica: cisplatina i tazemetostat

U stanicama Detroit 562, 3 μ M cisplatina je uzrokovala smanjenje proliferacije veće od 50%, u odnosu na kontrolu (p \leq 0,0001; Slika 14). Iako je na razini vijabilnosti stanica kombinirana primjena cisplatine i tazemetostata dovela do smanjenog učinka cisplatine, na razini proliferacije ovaj učinak nije opažen. Može se primijetiti trend porasta razine proliferacije koji nije statistički značajan, kada se uz cisplatinu stanice izlože DMSO ili tazemetostatu (cisplatina vs. cisplatina + tazemetostat; p=0,9152; Slika 14).

Mjerenje proliferacije stanica FaDu pokazalo je rezultate koji su bili u skladu s rezultatima dobivenim mjerenjem vijabilnosti stanica. Cisplatina je dovela do pada proliferacije stanica od 70%, u odnosu na kontrolni uvjet ($p \le 0,0001$; Slika 14). Kombinirana primjena cisplatine s DMSO i/ili tazemetostatom, nije rezultirala statistički značajnom razlikom proliferacije u odnosu na samostalnu primjenu cisplatine.

Najzanimljiviji rezultati, vezani uz mjerenje vijabilnosti stanica HT-29, na isti način su se pokazali i na razini proliferacije. Vidljivo je da tazemetostat aktivno potiče proliferaciju stanica kada se primjenjuje sam, ili u kombinaciji s cisplatinom (tazemetostat 116,5%, $p \le 0,0001$; cisplatina + TZM 112,07%, p=0,004; Slika 14). Ovo povećanje značajno je u i odnosu prema otapalu DMSO, koje se nije pokazalo biološki aktivnim u ovom biološkom modelu

(tazemetostat vs. DMSO, p=0,0009; cisplatina + TZM vs. cisplatina + DMSO p≤ 0,0001; Slika 14).

Značajno je da primjena tazemetostata zajedno s cisplatinom u potpunosti poništava inhibitorni učinak cisplatine na proliferaciju stanica HT-29. Ovaj učinak tazemetostata, prema našim saznanjima, do sada nije opisan u znanstvenoj literaturi. Pretraživanjem baze podataka PubMed, pronađen je samo jedan znanstveni rad u kojem je opisano da primjena tazemetostata na stanice raka debelog crijeva [253] povećava osjetljivost stanica na spoj ("platinum–acridine hybrid") u kojem se nalazi platina.

Kombinacija cisplatine i tazemetostata nije dovela do (pretpostavljenog) aditivnog i/ili sinergističkog učinka na stanice. Naprotiv, u slučaju stanica raka HT-29 tazemetostat se pokazao kao pro-proliferativan spoj. U kontekstu takvog djelovanja, zapitali smo se hoćemo li, možda, našu hipotezu potvrditi zauzimanjem drugačijeg pristupa problemu.

Primjenom tazemetostata inhibirali smo EZH2 kako bismo uklonili represivne oznake s promotora tumor supresorskih gena. Ovo djelovanje je temelj njegove primjene u kliničkoj medicini. Očekivali smo da će taj pristup omogućiti snažnije djelovanje cisplatine. To se nije dogodilo. Stoga smo pretpostavili (na temelju promjene vijabilnosti stanica Detroit 562 (Slika 10) i proliferacijskog potencijala stanica HT-29 (Slika 14)) da ovaj pristup, vrlo vjerojatno, potiče aktivnost gena čiji proteinski produkti suprimiraju djelovanje cisplatine. Zbog toga smo naš eksperimentalni sustav postavili u potpuno drugačiji kontekst: inhibirali smo antagoniste EZH2, KDM6A i KDM6B, i istražili hoćemo li na taj način pojačati djelovanje cisplatine. U tu svrhu odlučili smo se koristiti spoj GSK-J4, za koji je pokazano da je selektivni inhibitor ova dva enzima [207]. Učinak ovih spojeva na enzime EZH2, KDM6A i KDM6B prikazan je na slici 57.



Slika 57. Promjena aktivnosti transkripcije moduliranjem represivne oznake H3K27m3 djelovanjem tazemetostata i GSK-J4.

5.1.3. Određivanje koncentracije GSK-J4

S obzirom na to da smo s tazemetostatom radili već dulje vrijeme, a spoj GSK-J4 nikada ranije nismo koristili, pažljivo smo odredili koncentraciju koju ćemo u istraživanju koristiti. S obzirom na ranije raspravljene nedostake procjene vijabilnosti stanica na temelju njihovog metaboličkog statusa, djelovanje spoja GSK-J4 istražili smo samo testom ugradnje BrdU. Stanice su početno izložene djelovanju nekoliko različitih koncentracija GSK-J4, samostalno i u kombinaciji s cisplatinom. Kao što je bio slučaj s tazemetostatom, vrijeme izlaganja spoju GSK-J4 bilo je 72 sata. Stanice FaDu pokazale su se veoma osjetljivima na ovaj spoj, stanice Detroit 562 umjereno osjetljive, dok se linija HT-29 pokazala najotpornijom (Slika 15). Stoga, za razliku od cisplatine i tazemetostata, u daljnjim pokusima nije bilo moguće koristiti istu koncentraciju GSK-J4 na sve tri linije stanica. Primijenjene koncentracije GSK-J4 u daljnjem istraživanju bile 0,5 μM za FaDu, 1 μM za Detroit 562 i 2,5 μM za HT-29; i u samostalnoj, i u kombiniranom tretmanu.

5.1.4. Utjecaj tazemetostata i GSK-J4 na razinu H3K27me3

Ovaj doktorski rad temelji se na korištenju spojeva kojima se stanice zloćudnih tumora žele senzibilizirati na djelovanje cisplatine, moduliranjem razine supresivne oznake H3K27me3.

Zanimalo nas je na koji način primijenjeni uvjeti utječu na razinu H3K27me3. Metodom Western blot nismo uspjeli uočiti promjenu razine posttranslacijske modifikacije H3K27me3. Moguće je da se korišteno protutijelo nije moglo vezati za denaturirani protein nakon pripreme uzorka. U našim smo pokusima koristili lizate jezgara. Postoje međutim, i protokoli za samostalno izdvajanje histona čije se posttranslacijske modifikacije, u pravilu, analiziraju spektrometrijom masa [254]. Možda bismo, da smo uveli taj protokol imali kvalitetniji uzorak i analize bi bile uspješne. Umjesto toga, odlučili smo se za alternativnu metodu; razinu H3K27me3 provjerili smo metodom imunofluorescencije. Rezultati su prikazani na Slikama 16-18.

U stanicama Detroit 562 i HT-29 vidljiv je učinak tazemetostata i GSK-J4; samostalno i u kombinaciji s cisplatinom. Tazemetostat je doveo do smanjene razine oznake H3K27me3, dok je GSK-J4 doveo do povećanja. Ovo je u potpunosti očekivano. U stanicama FaDu može se primijetiti isti trend, s time da je razina oznake H3K27me3 porasla nakon korištenja samo cisplatine te cisplatine u kombinaciji s DMSO, kada se uspoređuje prema kontrolnom uvjetu. Možemo zaključiti da su spojevi tazemetostat i GSK-J4 aktivni i uistinu povezan s promjenama razine oznake H3K27me3 u zadanim eksperimentalnim uvjetima. Svakako treba napomenuti da je određena globalna razina H3K27me3, ali raspodjela oznake u odnosu na promotore ciljnih gena i dalje ostaje nepoznata.

5.1.5. Značajne promjene proliferacije u pojedinim eksperimentalnim uvjetima

U stanicama Detroit 562 potvrđen je snažan inhibitorni učinak cisplatine na proliferaciju stanica, a potvrđeno je i da njezina kombinacija s DMSO i/ili tazemetostatom ne dovodi do dodatnog smanjenja proliferacije (cisplatina vs. cisplatina + DMSO, p=0,9998; cisplatina vs. cisplatina + TZM, p=0,9483). Značajan je utjecaj spoja GSK-J4 koji, primijenjen samostalno (1 μ M), nije imao značajan utjecaj na proliferaciju, ali je njegova istovremena primjena s cisplatinom rezultirala sinergističkim učinkom u odnosu na smanjen stupanj proliferacije (p≤ 0,0001). Ovaj učinak značajan je i u odnosu na kombinaciju cisplatine i DMSO (p≤ 0,0001).

Stanice FaDu bile su osjetljive samo na cisplatinu koja je proliferaciju smanjila za približno 70% (slika 19, p \leq 0,0001). Primjena cisplatine u kombinaciji s drugim spojevima nije imala značajan učinak. Na temelju rezultata testa ugradnje BrdU može se zaključiti da GSK-J4, primijenjen samostalno kao 0,5 µM smanjuje proliferaciju stanica FaDu za približno 25%. Kombinacija GSK-J4 i cisplatine nije imala dodatni učinak. Moguće je da cisplatina primijenjena u ovoj koncentraciji (3 µM) već posjeduje izraziti citostatski učinak zbog kojeg se ne može izmjeriti relativno blagi antiproliferativni učinak GSK-J4. Ne može se isključiti mogućnost da bi niže koncentracije cisplatine (u odnosu na primijenjene) mogle imati aditivni/sinergistički učinak u kombinaciji s GSK-J4, u ovoj liniji stanica.

Najzanimljiviji rezultati dobiveni su analizom proliferacije stanica HT-29. Ono što je vidljivo na slikama 14 i 19, jest da tazemetostat potiče proliferaciju stanica HT-29 i u potpunosti poništava slab antiproliferativan učinak cisplatine. Za razliku od tazemetostata, kombiniranjem spoja GSK-J4 (2,5 μM) i cisplatine dobiven je sinergistički učinak, u odnosu na proliferaciju. Iako samostalno primijenjen GSK-J4 u ovoj koncentraciji nema učinka na proliferaciju stanica HT-29 razvidno je da pojačava antiproliferativni učinak cisplatine, pri čemu proliferacija stanica pada sa 81,61% (primjena samo cisplatine) na 50,25%. Dijametralno suprotni učinci tazemetostata i GSK-J4 upućuju na to da je mehanizam, kojim dolazi do povećanja ili smanjenja antiproliferativnog učinka cisplatine, ovisan o uspostavljanju i uklanjanju oznake H3K27me3, snažnog epigenetičkog biljega [57].

Izlaganje stanica spoju koji je antagonist odobrenog lijeka, logično, nije područje koje se često istražuje. Ipak, sinergistično djelovanje cisplatine i GSK-J4 pokazano je i stanicama hondrosarkoma [236]. Dodatno, tumori koji posjeduju mutaciju u genu *SMARC-4* (mutacija je prisutna u trećini karcinoma pluća ne-malih stanica) iznimno su osjetljivi na inhibiranje KDM6A/KDM6B spojem GSK-J4 [210].

5.2. Stupanj apoptoze u pojedinim eksperimentalnim uvjetima

Nakon što smo funkcionalnim staničnim testovima, kroz određivanje vijabilnosti i proliferacije, definirali eksperimentalne uvjete istraživanja, odredili smo stupanj apoptoze i specifičnosti staničnog ciklusa. Mjerenje apoptoze stanica Detroit 562 (Slika 20, Tablica 5) ukazalo je na pro-apoptotički učinak u onim eksperimentalnim uvjetima koji su uključivali cisplatinu. Cisplatina dovodi do smanjenja postotka živih stanica (kontrola 90,03 \pm 1,05%, cisplatina 85,28 \pm 3,11%; p=0,0167) i, sukladno tome, povećanja postotka stanica u kasnoj apoptozi (kontrola 2,68 \pm 0,77%, cisplatina 4,53 \pm 0,85%; p=0,0168). Opaženi učinci gotovo su u potpunosti posljedica djelovanja cisplatine, s obzirom na to da kombinacija cisplatine i ostalih spojeva nije dovela do dodatnih promjena. Nisu uočene značajne promjene u postotcima stanica u ranoj apoptozi i mrtvih stanica. Pogreške mjerenja koje su se pojavile (osobito u mjerenju udjela mrtvih stanica) u pojedinim analizama posljedica su malog postotka ciljnih stanica u analiziranom uzorku. Ovo je osobito dobro vidljivo u skupini mrtvih stanica, čiji je

udio manji od 0,2% (Slika 20). Opaženi učinak tazemetostata u kombinaciji s cisplatinom na vijabilnost stanica (Slika 10) nije se odrazio na apoptozu stanica.

Jedno od mogućih objašnjenja jest razlika u temeljni staničnim procesima na kojima se temelje primijenjene metode. Kao što je već rečeno, test MTT mjeri metaboličku aktivnost mitohondrija, na temelju koje se procjenjuje vijabilnost stanica [255], a cisplatina povećava aktivni sadržaj mitohondrija. Protočnom se citometrijom izravno mjeri udio stanica u apoptozi. Postoje dokazi da EZH2 može utjecati na metabolizam stanica raka prostate [256]. Vrlo je jasno pokazano, na modelu karcinoma mokraćnog mjehura, da EZH2 postavlja represivnu oznaku na promotor gena aldehid oksidaze (AOX1, od engl. *Aldehyde Oxidase 1*), što za posljedicu ima snažan porast NADPH (od engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), metabolita PPP (Put pentoza fosfata, eng. *Pentose Phosphate Pathway*) puta i sinteze nukleotida [257]. Stoga se ne može isključiti mogućnost da u našem modelu istraživanja inhibicija EZH2 tazemetostatom mogla utjecati na metabolizam stanice i samim time na rezultate testa MTT.

Udio stanica FaDu u apoptozi (Slika 21, Tablica 6) bio je sličan udjelima u stanicama Detroit 562. Cisplatina je uzrokovala smanjenje postotka živih stanica (kontrola $89,48 \pm 1,57\%$, cisplatina $85,03 \pm 0,89\%$; p=0,0207), koje je bilo nešto izraženije ($82,53 \pm 3,28\%$) kada je cisplatina kombinirana s tazemetostatom. Učinci uvjeta koji su uključivali cisplatinu nisu se statistički značajno razlikovali. Smanjenje postotka živih stanica odrazilo se na povećanje postotka stanica u ranoj i kasnoj apoptozi, iako bez statistički značajne razlike između uvjeta koji uključuju cisplatinu. Na temelju podataka o vijabilnosti stanica i apoptozi možemo zaključiti da u liniji stanica FaDu, kombinacija cisplatine i tazemetostata i/ili DMSO, nema značajni utjecaj na stupanj apoptoze, u odnosu na cisplatinu.

Stanice HT-29 su, u odnosu na promjenu vijabilnosti, bile najmanje osjetljive na djelovanje cisplatine. Mjerenjem apoptoze stanica (Slika 22, Tablica 7) nije pokazana statistički značajna promjena u postotku živih stanica, iako je vidljivo smanjenje postotka nakon izlaganja stanica cisplatini (p=0,1427). Postoji mogućnost da je ovo posljedica odstupanja u mjerenjima, što je vidljivo u nešto većim standardnim devijacijama mjerenja u eksperimentalnim uvjetima koji uključuju cisplatinu. Postotci stanica u ranoj apoptozi upućuju na citotoksični učinak cisplatine što je kompatibilno s izmjerenom vijabilnošću stanica; izmjeren je blagi utjecaj cisplatine na stanice. Postotci stanica u kasnoj apoptozi i mrtvih stanica nisu značajno različiti u odnosu na primijenjene eksperimentalne uvjete.

5.3. Eksperimentalni uvjeti i stanični ciklus

Promjene u proliferaciji stanica bile znatno izraženije u odnosu na vijabilnost, što je bio dobar razlog da se odredi postotak stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa: G0/G1, S i G2/M. Ovim mjerenjima dobiveni su podatci koji su bili djelomično kompatibilni s podatcima vezanim uz proliferaciju stanica. Također, ovi rezultati otvorili su i dodatna pitanja.

U liniji stanica Detroit 562 (Slika 23, Tablica 8) primjena spojeva od interesa, bez dodane cisplatine: DMSO, tazemetostata, GSK-J4 nije dovela do značajne promjene postotka stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Drugim riječima, izlaganje stanica ovim spojevima nije rezultiralo značajnim promjenama staničnog ciklusa, u odnosu na kontrolni uvjet. Međutim, ovi spojevi, u kombinaciji s cisplatinom, imaju učinak na stanični ciklus. Utjecaj otapala DMSO i tazemetostata očit je kroz povećanje udjela stanica koje se nalaze u fazama G0/G1. Statističkom analizom podataka jednosmjernim testom ANOVA, koji se koristio za usporedbu svih podataka dobivenih na jednoj liniji stanica, očite promjene koje postoje između pojedinih eksperimentalnih uvjeta (na primjer, cisplatina vs. cisplatina + DMSO vs. cisplatina + TZM) nisu se pokazale statistički značajnima. Ovo je vjerojatno posljedica nešto viših standardnih devijacija u mjerenjima, u nekim eksperimentalnim uvjetima (DMSO, tazemetostat i GSK-J4).

Stoga je napravljena nova analiza jednosmjernim testom ANOVA kojim smo analizirali razlike između eksperimentalnih skupina koje su uključivale cisplatinu. Ovom analizom uočene su razlike bile statistički značajne. Može su odmah uočiti utjecaj DMSO na povećanje postotka stanica u fazama G0/G1 u odnosu prema samoj cisplatini (cisplatina vs. cisplatina + DMSO, p=0,0004). Ovaj učinak još je izraženiji u stanicama izloženim cisplatini i tazemetostatu, a promjena je značajna i u odnosu na cisplatinu i u odnosu na cisplatinu kombiniranu s DMSO (cisplatina vs. cisplatina + TZM, p \leq 0,0001; cisplatina + DMSO vs. cisplatina + TZM, p \leq 0,0001). Zanimljiv je i utjecaj GSK-J4 u kombinaciji s cisplatinom. Iako nema razlike između djelovanja same cisplatine i cisplatine u kombinaciji s GSK-J4, treba uzeti u obzir da je GSK-J4 otopljen u DMSO koji se pokazao kao aktivna komponenta u kombinaciji s cisplatinom. Dakle, GSK-J4 nadvladava utjecaj otapala i *de facto* smanjuje postotak stanica u fazama G0/G1 (cisplatina + DMSO vs. cisplatina + GSK-J4, p=0,009).

U odnosu na primjenu same cisplatine, porast stanica u fazama G0/G1 u uvjetima cisplatina + DMSO i cisplatina + tazemetostat praćen je smanjenjem postotka jednako tretiranih stanica koje se nalaze u fazama S i G2/M. Ove podatke nužno je razmotriti u kontekstu rezultata mjerenja proliferacije stanica (Slika 19). Očit je stanoviti nesrazmjer između ovih rezultata.

Mjerenje proliferacije stanica Detroit 562 pokazalo je da ne postoji razlika u proliferaciji stanica kada se primjeni samo cisplatina te kombinacije cisplatine s DMSO ili tazemetostatom (Slike 14 i 19, p> 0,05). Poznato je da cisplatina uzrokuje zastoj staničnog ciklusa u fazama G2/M [258, 259]. Moguće je da DMSO i tazemetostat primijenjeni zajedno s cisplatinom barem djelomično poništavaju zastoj izazvan primjenom cisplatine i omogućuju napredovanje u novi ciklus, u faze G0/G1. Alternativno, možda primjena DMSO i tazemetostata s cisplatinom uzrokuje zastoj stanica u G0/G1 fazi.

U znanstvenoj literaturi postoje podatci o zastoju stanica u G1-fazi staničnog ciklusa, u stanicama podrijetlom od lekemija i limfoma izloženim djelovanju DMSO [260, 261]. Stazi i suradnici pokazali su, na stanicama glioblastoma, da farmakološka inhibicija EZH2 ne uzrokuje apoptozu stanica, ali uzrokuje zastoj u fazama staničnog ciklusa G0/G1. Ovaj zastoj popraćen je povećanom razinom proteina P21 i P27 [262]. Mi smo, također, zapazili povećanje razine proteina P21 u stanicama Detroit 562 (Slika 39) u eksperimentalnim uvjetima koji su uključivali DMSO i tazemetostat. Iako postoje dokazi da inhibicija EZH2 može uzrokovati zastoj u fazama G0/G1 postavlja se logično pitanje: Zašto se ovaj zastoj nije očitovao na razini ugradnje BrdU u DNA? Ako je ciklus stanica zaustavljen u fazi G0/G1, tada je manji postotak populacije stanica u S-fazi, tijekom koje dolazi do ugradnje BrdU u molekulu DNA. Pretraživanjem znanstvene literature nismo pronašli moguće objašnjenje za postojanje ovog fenomena. Još jedan neobjašnjen fenomen vezan je uz učinak spoja GSK-J4 u kombinaciji s cisplatinom. Očit je sinergistički učinak ove kombinacije na proliferaciju stanica Detroit 562 (Slika 19, $p \le 0.0001$), iako nije opažena razlika u raspodjeli udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa, u usporedbi sa samom cisplatinom. Na različitim modelima zloćudnih tumora in vitro pokazano je da primjena spoja GSK-J4 može uzrokovati zastoj u pojedinim fazama staničnog ciklusa, na primjer, u fazama G0/G1 [209, 211] i S [263]. Mi nismo uočili slične promjene. Jedna od pretpostavki je da GSK-J4 u kombinaciji s cisplatinom uzrokuje opće usporavanje staničnog ciklusa, pa je možda mjerenje nakon 48 sati izlaganja prekratko vrijeme da bi se značajnije promjene vezane uz preraspodjelu udjela stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa uočile. Dokazivanje ove hipoteze dobra je podloga za daljnje istraživanje.

U konačnici, opažene razlike između mjerenja ugradnje BrdU i staničnog ciklusa mogle bi biti posljedica nesavršenosti i nedovoljne preciznosti metoda koje smo koristili. Ugradnja BrdU u molekulu DNA događa se prvenstveno tijekom faze S staničnog ciklusa. S druge strane, metode mjerenja staničnog ciklusa oslanjaju se na korištenje boja koje se vežu na molekule DNA u

stanici, pri čemu broj veznih mjesta oscilira tijekom staničnog ciklusa. Također, mjerenje staničnog ciklusa izvodi se na instrumentu za protočnu citometriju koji, zbog tehničke izvedbe, analizira samo određeni broj stanica (u našim analizama mjeri se 5000 "događaja"), a granice između pojedinih faza staničnog ciklusa određuje osoba koja izvodi pokus i analizira podatke, a ne program mjernog instrumenta. Ovaj podatak je važan i zbog toga što stanice u našem eksperimentalnom modelu nisu rasle sinkronizirano. Zbog toga se očekuje značajan "rasap" izmjerenog signala. S druge strane, mjerenje proliferacije stanica izvodi se kolorimetrijskim esejem ELISA, u kojem se mjeri apsorbancija cjelokupnog uzorka, unutar jedne jažice.

Raspodjela stanica FaDu u pojedinim fazama staničnog ciklusa bila je slična raspodjeli stanica Detroit 562 (Slika 24, Tablica 9). Istovremena primjena cisplatine i tazemetostata dovela je do smanjenog postotka stanica koje se nalaze u fazama S + G2/M, što je bilo praćeno blagim porastom postotka stanica u fazama G0/G1, u odnosu prema cisplatini. Ova promjena nije dosegla granicu statističke značajnosti, vjerojatno zbog nešto većih standardnih devijacija mjerenja u odnosu na mjerenja stanica u fazama S + G2/M. Također, u stanicama FaDu, izlaganje samo tazemetostatu povećalo je udio stanica u fazama G0/G1, uz istovremeno smanjenje udjela stanica u fazama S + G2/M. Ova promjena značajna je u odnosu na kontrolu, međutim ne i u odnosu na otapalo, DMSO (kontrola vs. tazemetostat, p=0,0091; DMSO vs. tazemetostat, p=0,3184). Promjene postotka stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa nakon izlaganja stanica tazemetostatu nisu se očitovale na razini proliferacije mjerene testom BrdU. Isto kao i u stanica Detroit 562, potencijalni zastoj u G0/G1-fazi mogao bi se objasniti povećanom razinom proteina P21 u stanicama izloženim tazemetostatu (Slika 40).

Rezultatima mjerenja staničnog ciklusa stanica HT-29 (Slika 25, Tablica 10) dodatno je potvrđena otpornost ove linije na cisplatinu, u odnosu na linije stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata. Nakon primjene samo cisplatine, udio stanica u fazama G2/M manje je izražen nego u druge dvije linije (60% u odnosu na 80%). S druge strane, ove su stanice su osjetljive na kombinaciju cisplatine i DMSO, što se zaključuje na temelju povećanog udjela stanica u fazama G0/G1 i smanjenim udjelom u fazama S+G2/M. Isti rezultat zabilježen je i nakon izlaganja stanica kombinaciji cisplatine i tazemetostata. U ovom kontekstu, nema statistički značajne razlike između djelovanja DMSO i tazemetostata (faze G0/G1 p=0,9915; faze S+G2/M p=0,9961) i zbog toga, u ovom slučaju, ne možemo isključiti biološki utjecaj otapala. Razvidno je da kombinacija DMSO + tazmetostat u ovim stanicama djeluje proproliferativno, zbog toga što stanicama omogućuje prevladavanje zastoja staničnog ciklusa u fazama G2/M koje inducira cisplatina.

Iako je kombinacijom cisplatine i GSK-J4 došlo do smanjena razine proliferacije stanica HT-29 u odnosu prema samoj cisplatini, ovi rezultati nisu se odrazili na razini staničnog ciklusa. Kao što je ranije spomenuto, jedna od hipoteza jest da bi GSK-J4, u kombinaciji s cisplatinom, mogao dovesti do općeg usporavanja staničnog ciklusa, bez preraspodjele stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Također, iako je GSK-J4 otopljen u DMSO koji se pokusima pokazao izrazito aktivnim spojem, vidljivo je da GSK-J4 nadvladava utjecaj DMSO, u ovom eksperimentalnom sustavu.

5.4. Molekularno-genetičke analize transkripata i proteina

Istraživanje je nastavljeno na molekularno-genetičkoj razini, kako bi se objasnile promjene vidljive na razini proliferacije i staničnog ciklusa/apoptoze. Na početku ovog dijela istraživanja, željeli smo istražiti učinak eksperimentalnih uvjeta ciljano, na veći broj gena čiji su proteinski produkti uključeni u stanični ciklus i proliferaciju stanica. Za početni probir gena koristili smo pločice "TaqMan Array Human Cyclins & Cell Cycle Regulation" koje sadrže početnice i probe TaqMan za 48 gena (Slika 29). Zbog financijskih ograničenja, korištenjem ovih pločica je analizirana promjena razine transkripta gena u linijama stanica Detroit 562 i HT-29, u sljedećim uvjetima: 1) kontrola, 2) cisplatina, 3) cisplatina + TZM i 4) cisplatina + GSK-J4. Na temelju dobivenih podataka, nekoliko gena, čija se transkripcija značajno mijenjala (Tablice 12 i 13), odabrano je za daljnju validaciju metodama RT-qPCR, korištenjem boje SYBR Green, te Western blot, za analizu proteina. Odabrani geni bili su: *CDKN2C (P18), CDKN2A (P19), CDKN1A (P21), TGFB1, CCND2 (ciklin D2)* i *CDK2 (ciklin ovisna kinaza 2).* Osim ovih gena analizirani su i trankripti/proteini EZH2 i KDM6B zbog toga što su, na razini proteina, bili izravno inhibirani izlaganjem tazemetostatu i GSK-J4.

Za odabrane gene, s izuzetkom *EZH2*, konstruirane su početnice prikladne za daljnju analizu RT-qPCR i kemiju SYBR Green. Prilikom odabira početnica vodili smo računa da veličina umnoženog produkta budu manje od 200 parova baza, da barem jedna od početnica bude komplementarna spoju dva eksona te da početnicama budu obuhvaćene sve transkripcijske inačice analiziranog gena, navedene u bazi podataka NCBI. Početnice za EZH2 konstruirane su za potrebe prethodnih istraživanja.

Rezultati analize razine transkripata navedenih gena nalaze se na Slikama 31-38. S obzirom na to da je metoda RT-qPCR izrazito osjetljiva, značajnim rezultatima smo, u pravilu, smatrali barem dvostruko povećanje ili smanjenje razine transkripta gena. Analiza razine transkripata gena *CDKN2C* i *CDKN2A* te *CDK2* (Slike 31, 32, 34) u uvjetima validiranja nije pokazala,

prema našem mišljenju, dovoljno velike promjene da bi se istraživanje za ove gene nastavilo na razini njihovih proteinskih produkata. Ostali geni pokazali su značajne promjene u razini ispoljavanja transkripta i stoga su istražene i promjene na razini proteina.

5.4.1. CDKN1A (P21) i P53

Jedan od analiziranih gena jest gen *CDKN1A (P21)* čiji je proteinski produkt, P21, dobro poznat tumor supresorski gen. Ovaj protein pripada obitelji Cip/Kip inhibitora ciklin ovisnih kinaza. Ima sposobnost vezanja za ciklin ovisne kinaze 1 i 2, što dovodi do inhibicije njihove aktivnosti i do zaustavljanja staničnog ciklusa. Dodatno, P21 može se vezati i na protein PCNA (od engl. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), koji je poticatelj replikacije molekule DNA. Posljedica vezanja je zaustavljane procesa replikacije [264]. S druge strane, pokazano je da u određenom staničnom kontekstu P21 ima i pro-tumorsku aktivnost. Na primjer, pri niskim koncentracijama, protein P21 pozitivno modulira nastanak kompleksa ciklina D s ciklin ovisnim kinazama 4 i 6, što može potaknuti proliferaciju stanica [265]. U citoplazmi stanica se protein P21 može vezati za neke proapoptotske čimbenike (prokaspaza 3, kaspaza 8 i stresom aktivirane protein kinaze) i inhibirati njihovo djelovanje, čime se potiče preživljenje stanica u uvjetima stresa [266, 267]. Onkogena uloga P21 pokazana je u stanicama raka dojke koje prekomjerno ispoljavaju HER2. Zhou i suradnici pokazali su da u ovim stanica aktivirana protein kinaza AKT fosforilira P21 na treoninu 145, što dovodi do zadržavanja P21 u citoplazmi i za posljedicu ima poticanje rasta stanica raka [268].

Postoji nekoliko čimbenika transkripcije koji potiču transkripciju gena *CDKN1A*. Protein P53 najpoznatiji je i najbolje proučen čimbenik transkripcije koji potiče transkripciju *CDKN1A*, nakon oštećenja molekule DNA [269]. Cisplatina, kao jedan od protutumorskih lijekova koji uzrokuju znatno oštećenje molekule DNA dovodi do stabilizacije proteina P53 i njegovog nakupljanja u jezgri stanica [270]. S druge strane, protein P53 često je mutiran u stanicama tumora, što je slučaj i u tri linije stanica, koje su bile naši modeli istraživanja. Osim proteina P53, postoji nekoliko drugih proteina koji mogu aktivirati transkripciju gena *CDKN1A*, kao što su čimbenici transkripcije SP1 i SP3 (od engl. *Specificity Protein*), MIZ-1 (od engl. *Mycinteracting Zinc Finger Protein 1*) [271] te signalni put TGFβ [272].

Rezultati analize razine transkripta i proteina P21 vrlo su zanimljivi, osobito kada se uzme u obzir neslaganje rezultata dobivenih metodama RT-qPCR i Western blot.

Cisplatina je uzrokovala porast razine transkripta u svim linijama stanicama (Slika 33). U stanicama Detroit 562 porast razine transkripta CDKN1A potaknut je cisplatinom (porast +2,5 puta) te u svim eksperimentalnim uvjetima koji su uključivali cisplatinu (porast između +2,7 i +3 puta). Preostali spojevi, primijenjeni zasebno, nisu imali značajan učinak na promjenu razine transkripta CDKN1A. Kako bismo objasnili porast transkripcijske aktivnosti CDKN1A analizirali smo unutarstanični smještaj proteina P53 i promjenu jačine signala. U stanicama Detroit 562, došlo je do snažnog porasta razine proteina P53 u jezgri (Slika 42; linija 5-8), koja bi mogla dovesti do aktivacije transkripcije CDKN1A. Prema bazama podataka COSMIC i Expasy Cellosaurus, u liniji stanica Detroit 562 gen TP53, posjeduje mutaciju c.524G>A koja dovodi do zamjene aminokiseline arginin aminokiselinom histidin (R175H). Iako se u novoj znanstvenoj literaturi tvrdi da nije poznato da li je ova mutacija homo- (gubitak jednog alela, preostao mutirani alel) ili heterozigotna, Caano i suradnici su još 1993. godine pokazali da se radi o homozigotnom tipu mutacije [273]. Ova mutacija smještena je u domeni proteina nužnoj za vezanje na molekulu DNA i dovodi do gubitka fiziološke funkcije proteina. Willis i suradnici pokazali su da ovaj tip mutiranog P53 ima dominantno negativni učinak nad divljim tipom P53 i ometa njegovu funkciju u stanicama [274, 275]. No, u stanicama Detroit 562 divljeg tipa proteina nema. Vrlo je vjerojatno, da u ovom slučaju, kontrolu transkripcije CDKN1A "preuzimaju" drugi, ranije navedeni čimbenici transkripcije. Za potvrdu ove pretpostavke trebalo bi primijeniti metodu kromatinske imunoprecipitacije.

Analiza proteina P21 metodom Western blot jasno je ukazala da se promjene nastale na razini trankripta ne moraju automatski preslikati na razinu proteina. Analizom ukupnih proteina i proteina citoplazme jasno se može uočiti pad razine P21 nakon izlaganja stanica Detroit 562 svim uvjetma koji su uključivali cisplatinu (Slika 39; linije 5-8). Ovo je zanimljivo, budući da postoje istraživanja koja su pokazala da cisplatina inducira porast proteina P21 u stanicama karcinoma ovarija [276]. Jasan pad razine proteina P21 djelomično se poklapa s padom proliferacije stanica Detroit 562 (Slika 19) što upućuje na to da bi P21 u citoplazmi mogao doprinositi proliferativnom potencijalu stanice [268]. Međutim pad razine proteina P21 ne može objasniti dodatni pad proliferacije nakon kombinirane primjene cisplatine i GSK-J4 niti podatak da se proliferacija stanica ne mijenja pri kombiniranoj primjeni cisplatine i tazemetostata u odnosu na samostalnu primjenu cisplatine, iako je razina proteina P21, primarno u jezgri, izrazito povećana. Postoji mogućnost da je cisplatina uzrokovala povećano ispoljavanje mikro RNA koje su potom dovele do razgradnje P21 mRNA. Neke od obitelji miRNA koje mogu utjecati na transkript *CDKNIA* su obitelj miR-302 i miR-371-372 [277].

Dodatno, promjene složenih staničnih procesa kao što je proliferacija ne mogu se, i ne smiju, tumačiti promjenom razine samo jednog proteina.

S druge strane očit je porast razine proteina P21 nakon izlaganja stanica tazemetostatu (Slika 39, linija 3). Kao što je prethodno spomenuto Stazi i suradnici uočili su sličan fenomen nakon izlaganja stanica glioblastoma inhibitorima EZH2 (MC4040). Mehanizam nastanka ovog fenomena nije istražen [262]. Sigurno je da povećana razina proteina P21 nakon izlaganja tazemetostatu nije posljedica značajnog povećanja njegove transkripcije (Slika 33). Postoji mogućnost da tazemetostat dovodi do povećanog ispoljavanja nekog drugog gena čiji bi proteinski produkt mogao utjecati na stabilnost i/ili razgradnju P21. Porast količine proteina P21 nakon izlaganja stanica tazemetostatu očit je i u nuklearnoj frakciji proteina. Ovaj porast, međutim, nije praćen promjenom proliferacije stanica. S druge strane, povišena razina P21 u jezgri mogla bi objasniti opaženi povećani postotak stanica u fazama G0/G1 staničnog ciklusa.

S obzirom na promjenu razine transkripta CDKN1A stanice FaDu reagirale su slično stanicama Detroit 562. Međutim, u ovim je stanicama izlaganje samo cisplatini dovelo do znatno snažnijeg aktiviranja (+8 puta) transkripcije gena CDKN1A (Slika 33). Kombiniranje cisplatine s ostalim spojevima djelomično je umanjilo ovaj porast, iako je razina transkripta i dalje bila približno pet puta veća nego u kontrolnom uvjetu. Za razliku od stanica Detroit 562, u liniji FaDu izlaganje cisplatini nije rezultiralo značajnom promjenom u količini TP53 (ukupni proteini), niti je došlo do statistički značajne promjene (porasta) razine proteina P53 u jezgri. (citoplazma-jezgra; Slika 43). U bazi podataka COSMIC navedeno je da su stanice FaDu heterozigoti za mutaciju gena TP53 c.743G>T koja dovodi do zamjene aminokiseline arginin na poziciji 248 s leucinom (R248L). Međutim, ovaj podatak je netočan. Pregledom znanstvene literature pronašli smo radove koji su jasno pokazali da je u stanicama FaDu došlo do gubitka heterozigotnosti (LOH, od engl. Loss of Heterozygosity) lokusa na kromosomu 17 na kojem je smješten gen TP53. Preostali alel sadržava navedenu mutaciju c.743G>T. Zaključno, stanice FaDu su homozigoti za ovu mutaciju [273, 278]. Mutacija R248L uzrokuje gubitak fiziološke funkcije proteina P53 i djeluje kao dominantno negativni mutant u odnosu na divlji tip P53 [279]. Stoga je sigurno da u ovim stanicama porast razine transkripta P21 nije posljedica djelovanja proteina P53. Moguće je da ranije navedeni čimbenici transkripcije djeluju na transkripciju gena CDKN1A i u stanicama FaDu, ili da izlaganje stanica cisplatini uzrokuje stabilizaciju mRNA CDKN1A. Na razini proteina P21 stanice FaDu su odgovorile na eksperimentalne uvjete slično kao i stanice Detroit 562; nakon izlaganja cisplatini došlo je do smanjenje razine proteina P21 u ukupnim proteinima i proteinima citoplazme. Također, kao i

u liniji Detroit 562, tazemetostat je i u ovoj liniji stanica doveo do značajnog povećanja razine proteina P21.

U odnosu na aktivnost gena CDKN1A, stanice HT-29 pokazale su nešto različit odgovor u odnosu na linije stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata. Cisplatina je uzrokovala povećanje transkripta CDKN1A (+2,0 puta). Međutim povećanje je primijećeno i nakon izlaganja samo tazemetostatu (+2,5 puta), što nije zabilježeno u linijama stanica FaDu i Detroit 562 (Slika 33). Primjena tazemetostata u kombinaciji s cisplatinom dovodi do dodatnog, statistički značajnog povećanja (+4,5 puta; cisplatina vs. cisplatina + TZM, $p \le 0,0001$; tazemetostat vs. cisplatina + TZM, p=0,0001). Ovo povećanje značajno je i u odnosu na kontrolu, i u odnosu na otapalo, DMSO (cisplatina + DMSO vs. cisplatina + TZM, $p \le 0,0001$). Ovo upućuje na to da, u stanicama HT-29, transkripcijski represivna oznaka, H3K27me3, djeluje na utišavanje gena CDKN1A. U odnosu na P53, stanice HT-29 pokazale su sličnost sa stanicama Detroit 562: nakon izlaganja cisplatini došlo je povećanja razine proteina P53 u jezgri. Stanice HT-29 homozigoti u odnosu na mutaciju gena TP53 koja rezultira zamjenom arginina na poziciji 273 u histidin (R273H). Ova mutacija uzrokuje gotovo potpuni gubitak sposobnosti P53 za vezanje na molekulu DNA [280]. S obzirom na postojanje ove mutacije, i ovdje se nameće pitanje postojanja nekog drugog, o P53-neovisnog mehanizma, koji bi mogao biti odgovoran za porast razine mRNA CDKN1A nakon izlaganja cisplatini. Jedan mogući mehanizam za povećanje aktivnosti CDKN1A jest signalni put TGFβ koji može, kao što je ranije spomenuto, potaknuti transkripciju CDKNIA neovisno o proteinu P53 [272]. Analizom proteina TGFB1, metodom western blot, pokazana je povećana razina ovog proteina u stanicama HT-29, upravo nakon izlaganja tazemetostatu (Slika 50). Analizom promjene razine transkripata CDKN1A postavlja se pitanje može li tazemetostat, inhibiranjem EZH2 i uklanjanjem supresivne oznake H3K27me3 doprinijeti promjeni transkripcije, neovisno o razini metilacije molekule DNA u području promotora gena čija se transkripcija promijenila (primjer CDKN1A u stanicama HT-29). Prema podatcima iz literature – može. Kondo i suradnici su, na modelu karcinoma prostate pokazali da pribižno 5% utišanih gena posjeduje normo- ili hipometilirane promotore. Njihovu su transkripciju potaknuli inhibiranjem EZH2 i na temelju toga zaključili da je represivna oznaka H3K27me3 iznimno snažna i, u konačnom djelovanju, može biti funkcionalno nadređena metilaciji molekue DNA [281].

Analizom proteina P21, metodom Western blot, pokazani su fenomeni koji su drugačiji od onih koji su prisutni u stanicama FaDu i Detroit 562 (Slika 41). Cisplatina, na koju su stanice HT-29 relativno otporne, nije dovela do smanjenja razine P21 u citoplazmi. Tazemetostat je doveo

do povećanja količine razine P21; i na razini ukupnih proteina, i u svakoj pojedinoj frakciji u skladu s povećanom razinom transkripta *CDKN1A*. Povećana razina P21 u citoplazmi nakon izlaganja stanica tazemetostatu možda bi mogla objasniti povećanu proliferaciju stanica HT-29 (Slika 19), s obzirom na to da unutarstanični smještaj P21 utječe na njegovu funkciju; u citoplazmi može imati protumorske učinke koji su otkriveni u nekim eksperimentalnim modelima [268].

5.4.2. Ciklin D2

Ciklin D2, zajedno s ciklinima D1 i D3, čini skupinu proteina "Ciklin D" koji imaju ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Rezultati dobiveni metodom RT-qPCR pokazali su velike promjene u razinama transkripta ciklina D2, u nekim linijama stanica. U stanicama Detroit 562 primjetan je trend povećanja transkripta nakon izlaganja cisplatini, ali nije udvostručen u odnosu na kontrolu. Analizom Western blot pokazane su vrpce iznimno slabog intenziteta na ukupnim proteinima (Slika 45), dok u proteinima citoplazme i jezgre nije bilo signala. Ovo je iznenađujuće s obzirom na to da smo u znanstvenoj literaturi našli radove kojima je prisutnost ciklina D2 u stanicama Detroit 562 pokazana [282, 283]. Protutijela s kojima su istraživači radili su poliklonska (2002. godina) (u međuvremenu povučena s tržišta) [282], odnosno konstruirana i napravljena u laboratoriju (1998. godina), komercijalno nedostupna [283]. Jedno od objašnjenja za nemogućnost dokazivanja proteina je relativno kratko poluvrijeme života ciklina D2. He i suradnici pokazali su, na β-stanicama gušterače, da je poluvrijeme života ciklina D2 prilično kratko; većina proteina razgrađuje se unutar sat vremena [284]. Također, moguće je da različite mikro RNA inhibiraju translaciju mRNA ciklin D2, na primjer miR-409-3p [285] ili miR-135b-5p [286]. Prema bazama podataka, za ciklin D2 mRNA potencijalno bi se mogle vezati 337 miRNA [287].

U stanicama FaDu uočili smo povećanje razine transkripta u gotovo svim eksperimentalnim uvjetima u odnosu na kontrolu. Iznimka je bio tretman s DMSO (Slika 35, p>0,9999). Primjenom samo tazemetostata ili GSK-J4 došlo je do više nego dvostrukog povećanja transkripta ciklina D2 (+2,2 puta), a istovjetno povećanje uočeno je i nakon izlaganja cisplatini. Kombinacija cisplatine i tazemetostata dovela je do dodatnog, aditivnog, povećanja razine transkripta (+5,0 puta) u odnosu na primjenu individualnih spojeva (tazemetostat vs. cisplatina + TZM, p=0,0018; cisplatina vs. cisplatina + TZM, p=0,0007). Isto je uočeno i za kombinaciju cisplatine i GSK-J4, ali u značajno manjoj mjeri; promjena nije statistički značajna u odnosu prema učinku samo cisplatine (Slika 35, cisplatina vs. cisplatina + GSK-J4, p=0,1123).
Analizom Western blot pokazano je prisustvo ciklina D2 i u ukupnim proteinima, i u frakcijama jezgre i citoplazme (Slika 46). Trendovi promjene vidljivi u ukupnim proteinima i proteinima citoplazme pokazali su dobro slaganje s promjenama razine transkripata. Vidljiv je porast razine ciklina D2 u ukupnim proteinima i proteinima citoplazme nakon izlaganja cisplatini, tazemetostatu, i naročito, nakon primjene kombinacije cisplatine i tazemetostata.

Analizom proteina jezgre, u kojoj bi kompleksi proteina ciklin-ovisnih kinaza i ciklina D trebali biti aktivni, pokazane su prilično slab signal na kojima se može samo okvirno uočiti nešto veća razina ciklina D2 nakon izlaganja stanica tazemetostatu te cisplatini. Prema bazi podataka UniProt, ciklin D2 smješten je u jezgri i citoplazmi stanica [288], dok je u bazi podataka The Human Protein Atlas navedeno da je ciklin D2 smješten samo u jezgri [289, 290]. Alao i suradnici pokazali su da je u stanicama zloćudnog tumora dojke MCF-7 i MDA-MB231 ciklin D1 smješten najvećim dijelom upravo u citoplazmi stanica [291]. S obzirom na to da ciklin D1 i D2 pripadaju istoj obitelji i imaju sličnu strukturu, moguće je da je ciklin D2 primarno smješten u citoplazmi stanica FaDu. Zanimljivo je uočiti kako je upravo cisplatina, koja uzrokuje značajni pad proliferacije stanica FaDu (Slika 19), uzrokovala povećano ispoljavanje ciklina D2, koji potiče proliferaciju stanica. U znanstvenoj literaturi našli smo radove koji navode da je ciklin D2 povećano ispoljen u stanicama zloćudnog tumora vrata maternice otpornim na cisplatinu [292]. Međutim, u našem istraživanju, stanice FaDu bile su osjetljive na cisplatinu, barem u odnosu na smanjenje proliferacije. Pokazano je, također, da cisplatina dovodi do pada razine ciklina D2 u liniji stanica raka pluća A549 [293], što je u suprotnosti s našim rezultatima. Najvjerojatnije ova šarolikost podataka ukazuje na redundantne mehanizme regulacije koji ovise o ciklinu D2, ciklinu D1 i D3 (razinu kojih nismo mjerili) koji se uspostavljaju specifično, i u ovisnosti o podrijetlu stanica.

U stanicama HT-29 je izlaganje tazemetostatu, samostalno ili u kombinaciji s cisplatinom dovelo do porasta ciklina D2 za više od 150 puta u odnosu na kontrolu (Slika 35, kontrola vs. tazemetostat p=0,0003; kontrola vs. cisplatina + TZM, p=0,0004). Međutim, ovo veliko povećanje nije uočeno na razini proteina. Dapače, u niti jednoj analiziranoj skupini proteina (ukupni, citoplazmatski, jezgreni) nismo uočili vrpce koje bi odgovarale ciklinu D2 (Slika 47), što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja također nisu uspjela dokazati prisutnost ciklina D2 u pojedinim vrstama stanica raka [283, 164]. Ovaj podatak nije toliko iznenađujući s obzirom na to da ciklin D2, kao što je ranije rečeno, ima kratak poluživot. Treba napomenuti i da se u analizi RT-qPCR signal ciklina D2 javljao izrazito kasno – u kontrolnom uvjetu tek oko 36 ciklusa; nakon izlaganja tazemetostatu oko 29 ciklusa. Iako je ovo velika relativna

promjena razine transkripta u odnosu prema kontroli, porast apsolutnog broja transkripata, iako nedvojbeno postoji, nije morao biti dovoljno snažan (čak i pod uvjetom da su svi transkripti translatirani) da ciklin D2 dovede do razine detekcije metodom Western blot. U ostalim linijama stanica ciklin D2 se "javljao" u puno ranijim ciklusima u kontrolnim uvjetima: Detroit 562 – oko 26 ciklusa, FaDu – oko 23 ciklusa. S obzirom na razinu ciklina D2 u stanicama FaDu, vrlo je vjerojatno da posjeduju dodatne mehanizme koji stabiliziraju protein ciklin D2 i produljuju njegov poluživot.

5.4.3. TGFB1

Kvantificiranjem transkripta u stanicama Detroit 562 i FaDu pokazano je da dolazi do statistički značajne promjene razine transkripta TGFB1 u nekim eksperimentalnim uvjetima (Slika 36). Detroit 562: cisplatina (+1,7 puta; p=0,0119), cisplatina + DMSO (+1,6 puta; p=0,0435), cisplatina + GSK-J4 (+1,6 puta; p=0,0207). FaDu: cisplatina (+1,9 puta; p=0,0379), cisplatina + DMSO (+1,9 puta; p=0,0322). Iako prisutni, ovi pomaci u razini transkripcije nisu dosegli prethodno spomenut, kriterij značajnosti - dvostruki porast ili pad razine transkripta, u odnosu na kontrolni eksperimentalni uvjet. Značajan je bio porast transkripta TGFB1 u stanicama FaDu nakon izlaganja stanica cisplatini i GSK-J4 (u odnosu na kontrolu: $p \le 0,0001$); ovaj porast značajan je u odnosu na cisplatinu i cisplatinu kombiniranu s otapalom DMSO (Slika 36, cisplatina vs. cisplatina + GSK-J4, p=0,003; cisplatina + DMSO vs. cisplatina + GSK-J4, p=0,0035). Također, primjena samo GSK-J4 je u stanicama ove linije dovela do porasta transkripta (+1,9 puta), ali razlika nije dosegla statističku značajnost (p=0,1344). Ovi rezultati upućuju na moguće postojanje sinergističkog učinka cisplatine i GSK-J4, na razinu transkripta TGFB1 u stanicama FaD1.

Analiza proteina metodom Western blot u ove dvije linije stanica pokazala se problematičnom zbog sljedećeg razloga: proteini obitelji TGF β (TGFB1, TGFB2, TGFB3), kao što je opisano u poglavlju Uvod (1.3.2), izlučuju se iz stanice. Ovi proteini prvenstveno se nalaze u izvanstaničnom prostoru, i kao takvi, u stanicama se nalaze tijekom sinteze i tijekom određenog vremenskog perioda prije nego što se izluče u izvanstanični prostor. Zbog toga je razina ovih proteina unutar stanice niska, što značajno otežava njihovu kvantifikaciju. Također, protutijelo koje smo koristili za određivanje proteina TGFB1, koji je od primarnog interesa u ovom istraživanju se, osim za TGFB1, veže i na strukturno sličan protein, TGFB3.

Rezultati koje smo dobili analizom ukupnih proteina i proteina citoplazme odražavaju ove činjenice. Vrpce dobivene analizom ovih uzoraka slabog su intenziteta i svaki pokušaj kvantifikacije rezultirao bi značajnim pogreškama i/ili velikim standardnim devijacijama. U ukupnim proteinima dobivene su tri vrpce, dvije na visini, ili nešto manje u odnosu na vrpcu standarda molekularne mase 55 kDa, te jednu vrpcu veličine oko 58-60 kDa. Dvije vrpce približne veličine 55 kDa odgovaraju proteinima TGFB1 i TGFB3, prije proteolitičkog cijepanja, kojim nastaju "zreli" proteini koji se izlučuju izvan stanice. Baza podataka UniProt navodi da je molekulska masa proproteina TGFB1 44,341 kDa, a proproteina TGFB3 47,328 kDa. Iako brzina putovanja proteina u denaturirajućem gelu poliakrilamida primarno ovisi o njihovoj masi, može se dogoditi da protein unutar gela ne putuje brzinom koja odgovara njegovoj molekularnoj masi određenoj primarnom strukturom proteina. Na primjer, protein P53 ima molekulsku masu oko 44 kDa, a redovito se, nakon putovanja kroz gel poliakrilamida, vizualizira na "visini" od 53 kDa. Dodatno, analizom slika Western blotova drugih proizvođača protutijela za TGFB1 vrpce koje odgovaraju TGFB1 nalaze u području koje odgovara visini od 55 kDa. Postoji nekoliko mogućih razloga koji bi uzrokovali ovakvo "ponašanje" proteina u gelu. Proteini koji imaju veliki broj pozitivno nabijenih aminokiselina ili proteini koji sadrže veliki udio aminokiseline prolin putuju sporije kroz gel [294]. Različite posttranslacijske modifikacije proteina, poput fosforilacije, ubikvitinacije, SUMOilacije ili glikozilacije mogu utjecati na elektroforetsku pokretljivost proteina. Budući da se proteini TGFB1 i TGFB3 izlučuju izvan stanice, ovi proteini prilikom sinteze prolaze kroz Golgijev aparat i postoji mogućnost glikoziliraju na određenim aminokiselinama. Računalna analiza programima NetNGlyc-1.0 [295] i NetOGlyc-4.0 [296] pokazala je da postoje potencijalna mjesta glikozilacije u ovim proteinima. U bazi podataka UniProt za protein TGFB1 navedeno je potencijalno mjesto (aminokiselina) glikozilacije proteina na temelju računalne analize i eksperimentalnih podataka. Stoga je uistinu moguće da su ova dva proteina glikozilirana i da to utječe na njihovo putovanje kroz gel.

Kada se promatraju dvije vrpce koje odgovaraju TGFB1 i TGFB3, u stanicama Detroit 562 i FaDu, ne možemo zaključiti da je došlo do bilo kakve promjene razine proteina u eksperimentalnim uvjetima (Slike 48 i 49), neovisno o povećanoj razini transkripta (Slika 36) u uvjetu cisplatina + GSK-J4, u stanicama FaDu.

Osim ove dvije vrpce može se primijetiti postojanje već spomenute, treće vrpce, koja se pojavljuje u razini standarda na od 58-60 kDa. Ova vrpca prisutna je u frakciji ukupnih proteina i u proteinima jezgre, ali je nema u proteinima citoplazme. Ovi reproducibilni rezultati upućuju na protein koji se nalazi isključivo u jezgrama stanice. Također, ovaj signal puno je jači u proteinima jezgre nego ukupnim proteinima što je očekivano s obzirom na to da je udio proteina

jezgre u ukupnim proteinima značajno manji u odnosu na proteine citoplazme. Proizvođač korištenog protutijela, Cell Signaling Technology, ne navodi mogućnost detektiranja vrpce na visini 58-60 kDa. U dostupnoj literaturi nismo pronašli slične podatke.

Postoji nekoliko mogućih objašnjenja; prvo je to da se protutijelo uistinu vezalo za proproteine TGFB1 i TGFB3 koji su, zbog nekog razloga, prisutni u jezgri stanica. Ovo bi bilo izrazito zanimljivo otkriće, budući da je poznato da su proteini obitelji TGFβ prvenstveno prisutni u izvanstaničnom prostoru. Nikada nisu dokazani u jegrama. Računalnom analizom programomom NLStradamus [297] nije pronađen slijed NLS (od engl. Nuclear Localization Signal) u proteinima TGFB1 i TGFB3. U skladu s ranije raspravljenim, ne može se isključiti mogućnost da neka posttranslacijska modifikacija, koja je odgovorna za povećanje mase proteina, za posljedicu ima sporije putovanje kroz gel, i dodatno usmjeravanje proteina u jezgru. U literaturi postoje podatci vezani uz ovaj fenomen; unutarstanični smještaj Jak2, na primjer, određen je razinom njegove SUMOilacije [298]. Ne može se isljučiti niti mogućnost postojanja genskih varijanata TGFB1 / TGFB3 koje bi dovele do alternativnog prekrajanja transkripta, na primjer, neizrezivanja introna ili uključivanja dijela introna, što bi moglo objasniti opaženo povećanje mase proteina. Međutim, u bazama podataka Expasy i COSMIC, u genima TGFB1 i TGFB3 nisu navedene varijante ovog tipa, pa je postojanje ovog scenarija malo vjerojatno. Dodatno, bilo bi neobično da se ista promjena nalazi u sve tri analizirane linije stanica. Još jedan problem je što se intenzitet dobivenih vrpci značajno razlikuje između bioloških replikata, zbog čega, nažalost, imamo i veliku standardnu devijaciju vezanu uz mjerenje signala ovih vrpci (denzitometrija). Drugo, možda i najvjerojatnije objašnjenje s obzirom na sve navedeno, jest da se protutijelo nespecifično vezalo na neki protein koji je "prirodno" prisutan u jezgri stanica. Ovaj scenarij nije naročito izgledan, s obzirom na to da je korišteno protutijelo, prema deklaraciji proizvođača, monoklonalno. U konačnici, analiza spektrometrijom masa mogla bi razjasniti identitet proteina koji odgovara opaženoj vrpci.

U stanicama HT-29 zapazili smo veliko povećanje razine transkripta TGFB1 nakon izlaganja stanica tazemetostatu; individualno (+180 puta) i u kombinaciji s cisplatinom (+180 puta). Ovo povećanje značajno je u odnosu na kontrolu i u odnosu na otapalo DMSO (Slika 36, kontrola vs. tazemetostat p=0,0003; DMSO vs tazemetostat p=0,0004; cisplatina vs. cisplatina + TZM p=0,0004; cisplatina + DMSO vs. cisplatina + TZM p=0,0004). S obzirom na to da nema statistički značajne razlike između ova dva eksperimentalna uvjeta (tazemetostat vs cisplatina + TZM p>0,9999), može se zaključiti da je za ovu promjenu prvenstveno odgovorno djelovanje tazemetostata. Kao najvjerojatnije objašnjenje opaženog fenomena jest smanjen broj

supresivnih oznaka H3K27me3 na promotoru i/ili ostalim regulatornim elementima o kojima ovisi transkripcija gena *TGFB1*. U ovom trenutku nismo bili u mogućnosti provjeriti razinu H3K27me3 na promotoru ovog gena, ali pokuse planiramo izvesti u budućnosti. Ovaj porast transkripta praćen je porastom proteina u stanici, što smo detektirali metodom Western blot (Slika 50). Porast je očit u ukupnim proteinima i proteinima citoplazme u stanicama HT-29, najviše nakon izlaganja tazemetostatu. U ostalim eksperimentalnim uvjetima jačina signala je slaba, a u nekim slučajevima na razini buke. Kao i u ostale dvije analizirane linije stanica, u proteinima jezgre zapažena je vrpca veličine 58-60 kDa, promjenjivog intenziteta u odnosu na eksperimentalne uvjete.

Povećanje količine TGFB1 u stanicama vjerojatno znači da je povećana sinteza TGFB1 i, posljedično, razina izvanstaničnog TGFB1 koji može aktivirati različite signalne putove. Kao što je spomenuto u poglavlju Uvod (1.3.2.1), u ranim stadijima razvoja raka protein TGFB1 ima tumor supresorsko djelovanje koje ostvaruje poticanjem ispoljavanja tumorsupresora P21, P27, kinaze DAP i drugih proteina [191, 192, 193, 194, 195]. Povećanje razine proteina P21 smo dokazali u pojedinim eksperimentalnim uvjetima. Glavni signalni put TGF Beta uključuje proteine SMAD koji se, nakon aktivacije, translociraju u jezgru stanica i potiču transkripciju ciljnih gena. U kasnijim stadijima bolesti ovaj signalni put je inaktiviran u stanovitom broju tumora. Pretraživanjem baze podataka COSMIC pronašli smo da je ključni protein ovog signalnog puta, SMAD4, mutiran u stanicama HT-29. Mutacija Q311*, koja dovodi do preuranjenog STOP-kodona prilikom translacije proteina, prisutna je na oba alela u ovoj liniji stanica.

Aktivirani receptori TGF-β mogu aktivirati i druge signalne putove, neovisne o proteinima SMAD; na primjer signalni put MAPK ili signalni put PI3K/AKT/mTOR [185, 187]. Budući da je kanonski signalni put zbog postojanja mutacije proteina SMAD4 neučinkovit, moguće je da, zbog redundantnosti prijenosa signala posredovanih s TGFB1, dolazi do aktivacije signalnog puta MAPK ili PI3K/AKT/mTOR. U ovom scenariju, u konačnici se očekuje snažnija proliferacijska aktivnost stanice, koju smo mi i opazili (Slika 19).

5.4.4. EZH2

Razina transkripta gena *EZH2* u stanicama Detroit 562 nije se značajno mijenjala u odnosu na eksperimentalne uvjetie. Na razini proteina također nisu uočene promjene u razini proteina EZH2; niti u ukupnim proteinima, niti u proteinima jezgre. Rezultati mjerenja EZH2 u citoplazmi pokazali su da razina proteina opada nakon izlaganja cisplatini, a vidljiv je porast

proteina nakon izlaganja tazemetostatu; samostalno ili u kombinaciji s cisplatinom. Iako je trend vidljiv, porast nije dosegao statističku razinu značajnosti, najvjerojatnije zbog nešto većih standardnih devijacija.

Moguće je da tazemetostat nekim, za sada nepoznatim, mehanizmom uzrokuje preraspodjelu EZH2 iz jezgre u citoplazmu. Budući da je EZH2 većinom smješten u jezgri ovu preraspodjelu možda je teško uočiti u uzorcima proteina jezgre. U citoplazmatskoj frakciji proteina uočili smo dodatnu vrpcu proteina molekularne mase nešto manje od 130 kDa. Prema bazi podataka UniProt, molekularna masa najdulje proteinske izoforme EZH2 je približno 86 kDa. Druge istraživačke skupine također su uočile postojanje nekoliko vrpci prilikom analize Western blot EZH2 [299, 300], ali ne na visini koja odgovara molekulskoj masi od 130 kDa. Možda se korišteno protutijelo nespecifično veže na neki protein prisutan samo u citoplazmi, ili je u pitanju neka od posttranslacijskih modifikacija, koje bi mogle potencijalno zadržati EZH2 u citoplazmi. U literaturi smo pronašli rad u kojem je pokazano da fosforilacija EZH2 na tirozinu 367 potiče smještaj EZH2 u citoplazmu [301]. Osim fosforilacijom, EZH2 se može postranslacijski modificirati na druge načine, na primjer metilacijom, acetilacijom, ubikvitinicijom [302]. Možda jedna od ovih modifikacija zadržava EZH2 u citoplazmu i usporava putovanje kroz gel. Dodatni pokusi koji bi uključivali spektrometriju masa mogli bi objasniti ovaj fenomen.

U stanicama FaDu došlo je do porasta količine transkripta EZH2 nakon izlaganja cisplatini (+2,1 puta) (Slika 37). Kombinacije cisplatine s drugim spojevima dovele su do određenog pada razine transkripta. Ova razlika značajna je samo kada se uspoređuju cisplatina te cisplatina + GSK-J4 (p=0,0046). Međutim, ovdje se uglavnom radi o učinku otapala, zbog toga što ne postoji razlika između djelovanja GSK-J4 i DMSO u kombinaciji s cisplatinom (p=0,9063). Analizom frakcija proteina nije pokazana statistički značajne promjena razine proteina EZH2 (Slika 52). Dodatna vrpca, molekulske mase manje od 130 kDa, koja postoji u citoplazmi stanica Detroit 562, ovdje je bila izrazito slabog intenziteta, gotovo na razini intenziteta pozadine.

Opisani eksperimentalni uvjeti u stanicama HT-29 nisu doveli do značajne promjene u razini transkripta EZH2. Na razini ukupnih proteina nisu postojale značajne promjene u količini EZH2, kao ni u proteinima jezgre. Kao i u stanicama Detroit 562, tazemetostat je uzrokovao porast proteina EZH2 u frakciji proteina citoplazme. Dodatna vrpca, na visini ispod 130 kDa, koja postoji u citoplazmi stanica Detroit 562, uočena je i u ovim uzorcima.

Iako je u znanstvenim publikacijama pokazano da je EZH2 neophodan za proliferaciju nekih vrsta stanica i da je prekomjerno ispoljen u određenim vrstama raka [119, 120, 121, 122, 123], naši rezultati ne pokazuju povezanost proliferacije i razine proteina EZH2, u ovim eksperimentalnim uvjetima i modelima.

5.4.5. KDM6B

Svi eksperimentalni uvjeti uzrokovali su povećanje razine transkripta KDM6B u stanicama Detroit 562, iako povećanje nije statistički značajno u uvjetima vezanim uz primjenu GSK-J4 (Slika 38). Porast transkripta nakon izlaganja stanica samo tazemetostatu ili GSK-J4 nije bio značajno različit od utjecaja samog otapala, DMSO (DMSO vs. tazemetostat p=0,911; DMSO vs. GSK-J4 p=0,9427). Cisplatina je također uzrokovala porast razine transkripta, pri čemu je kombinacija cisplatine i tazemetostata imala snažan aditivan ili sinergistički učinak (+4 puta). Ova promjena pokazala se značajnom u odnosu na cisplatinu i cisplatinu kombiniranu s DMSO (cisplatina vs. cisplatina + TZM p=0,0002; cisplatina + DMSO vs. cisplatina + TZM p=0,0006). Ovo upućuje na stanoviti biološki učinak tazemetostata, neovisno o djelovanju otapala, DMSO. Jedna od mogućnosti je da je transkripcija KDM6B, barem djelomično, ograničena transkripcijski represivnom oznakom H3K27me3. Inhibicija postavljanja ove oznake tazemetostatom možda je potaknula transkripciju gena *KDM6B*, što se moglo i izmjeriti.

Promjene količine transkripta nisu se očitovale na razini proteina (Slika 54). Jedno od objašnjenja je moguća prisutnost miRNA koje inhibiraju translaciju ovog transkripta, na primjer miR-146a [303] ili miR-939 [304]. Može se uočiti trend smanjenja proteina u citoplazmi stanica nakon djelovanja cisplatine, ali promjena nije statistički značajna, s obzirom na varijabilnost u mjerenju, između bioloških duplikata. Također, važno je napomenuti kako je KDM6B prvenstveno smješten u jezgri stanica. Njegova je količina u citoplazmi mala, što doprinosi većim greškama prilikom mjerenja, u odnosu na proteine kojih u stanici ima puno. Nakon izlaganja cisplatini dolazi do malog porasta KDM6B u frakciji proteina jezgre i njegovog istovremenog smanjenja u citoplazmi.

U odnosu na ispoljavanje i preraspodjelu proteina KDM6B stanice FaDu razlikovale su se u odnosu na stanice Detroit 562. Do porasta transkripta KDM6B (Slika 38) došlo je u eksperimentalnim uvjetima u kojima su stanice bile izložene cisplatini. Kombiniranje cisplatine s drugim spojevima nije se odrazilo na razinu transkripta KDM6B. Međutim, porast razine transkripta nije bio praćen statistički značajnim porastom razine proteina KDM6B (Slika

55), u ukupnim proteinima stanica. Moguće je da, slično kao u stanicama Detroit 562, mikro RNA interferiraju s translacijom KDM6B. Međutim, nakon izlaganja stanica cisplatini, došlo je do očitog pada KDM6B u citoplazmi stanica. Ovaj pad statistički je značajan nakon analize jednosmjernim testom ANOVA, uz isključivanje podataka koji su dobiveni nakon izlaganja stanica DMSO i GSK-J4, primarno zbog velike varijabilnosti između bioloških replikata. Istovremeno se može primijetiti porast razine KDM6B proteina u jezgri nakon izlaganja cisplatini (razlika nije statistički značajna). Biološki značaj ove preraspodjele nije dovoljno dobro istražen, iako postoje znanstvene publikacije koje su pokazale da se smještaj KDM6B u stanicama može mijenjati u odgovoru stanice na stres [305]. Također, zanimljiv je podatak da se smanjenje razine KDM6B u citoplazmi podudara sa smanjenom proliferacijom stanica FaDu nakon izlaganja cisplatini. U ovom trenutku ne možemo procijeniti jesu li ova dva fenomena povezana.

Za razliku od stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata, u stanicama HT-29 nije zabilježena promjena u razini KDMB6, niti na razini transkripta, niti na razini proteina.

Sveukupni rezultati dobiveni ovim istraživanjem definiraju novu perspektivu na kombiniranje cisplatine sa spojevima koji utječu na epigenetičku supresivnu oznaku H3K27me3. Suprotno većini do sada objavljenih publikacija, nismo uočili aditivne ili sinergističke učinke primjene inhibitora EZH2, tazemetostata, i cisplatine. Ova kombinacija nije imala učinak na proliferaciju stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata, dok je u stanicama podrijetlom od zloćudnog tumora debelog crijeva rezultirala značajnim antagonističkim učinkom. S druge strane, pokazali smo da dijametrano suprotan pristup; inhibicija KDM6A i KDM6B, koje uklanjanju H3K27me3, u kombinaciji s cisplatinom dovodi do smanjene proliferacije stanica Detroit 562 i HT-29. Opažene promjene istražili smo na molekularno-genetičkoj razini, analizom transkripata i proteinskih produkata gena koji imaju ključne funkcije u staničnom ciklusu. Posebno zanimljivi rezultati povezani su s aktivnošću gena *CDKN1A* i *TGFB1*, kojima se može objasniti dio opaženih fenomena, osobito onih koji su vezani uz proliferaciju.

U konačnici, ovi rezultati snažno ukazuju na stanično specifičan odgovor u zadanim eksperimentalnim modelima i dodatno potvrđuju specifičnost i složenost epigenetičkih procesa u zloćudno promijenjenim stanicama. Nadamo se da će ovi rezultati poslužiti kao podloga za daljnja ispitivanja kojima bi se odredila učinkovitost inhibicije enzima KDM6A i KDM6B u kombinaciji s drugim protutumorskim lijekovima, u pretkliničkim modelima.

6. ZAKLJUČCI

- Primjena 3 µM cisplatine nije se značajno odrazila na metaboličku vijabilnost stanica iako postoji slab apoptotski učinak, koji je izraženiji u kombiniranoj primjeni s tazemetostatom.
- Utjecaj cisplatine na proliferaciju stanica ovisi o podrijetlu linije: najosjetljive su bile FaDu, najmanje osjetljive HT-29.
- Tazemetostat nema učinak na proliferaciju stanica podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata, ali potiče proliferaciju stanica podrijetlom od karcinoma kolona (HT-29), u kojima poništava antiproliferacijski učinak cisplatine.
- Antagonist tazemetostata, GSK-J4, smanjuje proliferaciju stanica, prema redu osjetljivosti: FaDu > Detroit 562 > HT-29.
- Kombinirana primjena cisplatine i GSK-J4 u stanicama Detroit 562 i HT-29 ima aditivan/sinergistički učinak koji izostaje u liniji stanica FaDu.
- Cisplatina, samostalno ili u kombinacijama, potiče transkripciju gena *CDKN1A* u sve tri linije stanica, koje je, u stanicama Detroit 562 i FaDu, praćeno smanjenom razinom proteina P21. Ovaj fenomen nije uočen u stanicama HT-29.
- Tazemetostat je uzrokovao povećanje razine proteina P21 u svim linijama stanica.
- U stanicama Detroit 562 i HT-29, neovisno o tretmanima, nema ciklina D2. U stanicama FaDu primjena cisplatine (samostalno ili u kombinacijama) te tazemetostata uzrokuje porast ciklina D2. Tazemetostat i cisplatina imaju aditivni učinak na ovaj porast.
- U stanicama HT-29 primjena tazemetostata, samostalno ili s cisplatinom, za posljedicu ima porast transkripta i proteina TGFB1. Porast se poklapa s pojačanom proliferacijom.

7. LITERATURA

1. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. Genes Dev. 2009;23:781-3.

2. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003;33:245-54.

3. Meissner A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. Nat Biotechnol. 2010;28:1079-88.

4. Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. Nat Rev Genet. 2011;12:565-75.

5. Gendrel AV, Heard E. Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2014;30:561-80.

6. Kazazian HH Jr, Goodier JL. LINE drive. retrotransposition and genome instability. Cell. 2002;110:277-80.

7. Jähner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Löhler J, Simon I, Jaenisch R. De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. Nature. 1982;298:623-8.

8. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. Nat Biotechnol. 2010;28:1057-68.

9. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. Circulation. 2011;123:2145-56.

10. Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, Ukomadu C, Sadler KC, Pradhan S, Pellegrini M, Jacobsen SE. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:8689-94.

11. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. Nat Rev Genet. 2018;19:81-92.

12. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. J Biol Chem. 2004;279:48350-9.

13. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell. 1992;69:915-26.

14. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. Gene. 1999;236:87-95.

15. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell. 1999;99:247-57.

16. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. Nucleic Acids Res. 1980;8:1499-504.

17. Sved J, Bird A. The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:4692-6.

18. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 2011;25:1010-22.

19. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet. 2013;14:204-20.

20. Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. Nat Rev Genet. 2005;6:403-10.

21. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology. 2013;38:23-38.

22. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. Nucleic Acids Res. 1993;21:4886-92.

23. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol Cell Biol. 1998;18:6538-47.

24. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature. 1998;393:386-9.

25. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. Nat Genet. 1999;23:58-61.

26. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11:607-20.

27. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. Genes Dev. 2016;30:733-50.

28. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature. 1997;389:251-60.

29. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:436-47.

30. Zhou J, Fan JY, Rangasamy D, Tremethick DJ. The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. Nat Struct Mol Biol. 2007;14:1070-6.

31. Saksouk N, Simboeck E, Déjardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. Epigenetics Chromatin. 2015;8:3.

32. Luger K, Richmond TJ. The histone tails of the nucleosome. Curr Opin Genet Dev. 1998;8:140-6.

33. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev. 1998;12:599-606.

34. Filippakopoulos P, Knapp S. The bromodomain interaction module. FEBS Lett. 2012;586:2692-704.

35. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. Nature. 1999;399:491-6.

36. Agalioti T, Chen G, Thanos D. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. Cell. 2002;111:381-92.

37. Parthun MR. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. Oncogene. 2007;26:5319-28.

38. Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. Cell. 1996;87:1261-70.

39. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell. 1996;87:953-9.

40. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;6:a018713.

41. Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. Cell Res. 2007;17:195-211.

42. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. Nat Rev Genet. 2012;13:343-57.

43. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011;21:381-95.

44. Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. Trends Biochem Sci. 2003;28:69-74.

45. Qian C, Zhou MM. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. Cell Mol Life Sci. 2006;63:2755-63.

46. Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. Curr Biol. 2002;12:1052-8.

47. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell. 2004;119:941-53.

48. Shi Y, Whetstine JR. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. Mol Cell. 2007;25:1-14.

49. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. Nature. 2006;439:811-6.

50. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature. 2002;419:407-11.

51. Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N, Jenuwein T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. Nat Genet. 2002;30:77-80.

52. McGinty RK, Tan S. Nucleosome structure and function. Chem Rev. 2015;115:2255-73.

53. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. Science. 2006;311:844-7.

54. Lu X, Simon MD, Chodaparambil JV, Hansen JC, Shokat KM, Luger K. The effect of H3K79 dimethylation and H4K20 trimethylation on nucleosome and chromatin structure. Nat Struct Mol Biol. 2008;15:1122-4.

55. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland RA. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:20980-5.

56. Alabert C, Barth TK, Reverón-Gómez N, Sidoli S, Schmidt A, Jensen ON, Imhof A, Groth A. Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. Genes Dev. 2015;29:585-90.

57. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science. 2002;298:1039-43.

58. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature. 2004;431:873-8.

59. Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, Stokes N, Su IH, Hannon G, Tarakhovsky A, Fuchs E. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. Cell. 2009;136:1122-35.

60. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. Nature. 2006;441:349-53.

61. Aloia L, Di Stefano B, Di Croce L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. Development. 2013;140:2525-34.

62. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011;469:343-9.

63. Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, Fischle W, Bonaldi T, Pasini D. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. Mol Cell. 2014;53:49-62.

64. Højfeldt JW, Laugesen A, Willumsen BM, Damhofer H, Hedehus L, Tvardovskiy A, Mohammad F, Jensen ON, Helin K. Accurate H3K27 methylation can be established de novo by SUZ12-directed PRC2. Nat Struct Mol Biol. 2018;25:225-232.

65. Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domaincontaining UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:18439-44.

66. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. EMBO J. 2004;23:4061-71.

67. Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. Mol Cell. 2004;15:57-67.

68. Vizán P, Beringer M, Ballaré C, Di Croce L. Role of PRC2-associated factors in stem cells and disease. FEBS J. 2015;282:1723-35.

69. Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A, Popkin D, Pillus L, Jenuwein T. Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. EMBO J. 1997;16:3219-32.

70. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. Mol Cell. 2008;32:503-18.

71. Han Z, Xing X, Hu M, Zhang Y, Liu P, Chai J. Structural basis of EZH2 recognition by EED. Structure. 2007;15:1306-15.

72. Wu H, Zeng H, Dong A, Li F, He H, Senisterra G, Seitova A, Duan S, Brown PJ, Vedadi M, Arrowsmith CH, Schapira M. Structure of the catalytic domain of EZH2 reveals conformational plasticity in cofactor and substrate binding sites and explains oncogenic mutations. PLoS One. 2013;8:e83737.

73. Tan JZ, Yan Y, Wang XX, Jiang Y, Xu HE. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. Acta Pharmacol Sin. 2014;35:161-74.

74. Nekrasov M, Wild B, Müller J. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. EMBO Rep. 2005;6:348-53.

75. Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, Bernstein E. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. Trends Genet. 2007;23:494-502.

76. Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. Genes Dev. 2004;18:2627-38.

77. Wang L, Jin Q, Lee JE, Su IH, Ge K. Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:7317-22.

78. Pinter SF, Sadreyev RI, Yildirim E, Jeon Y, Ohsumi TK, Borowsky M, Lee JT. Spreading of X chromosome inactivation via a hierarchy of defined Polycomb stations. Genome Res. 2012;22:1864-76.

79. Wutz A, Gribnau J. X inactivation Xplained. Curr Opin Genet Dev. 2007;17:387-93.

80. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature. 2006;439:871-4.

81. Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. Genes Dev. 2006;20:1123-36.

82. Faust C, Schumacher A, Holdener B, Magnuson T. The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. Development. 1995;121:273-85.

83. O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycombgroup gene Ezh2 is required for early mouse development. Mol Cell Biol. 2001;21(:4330-6.

84. Shpargel KB, Sengoku T, Yokoyama S, Magnuson T. UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. PLoS Genet. 2012;8:e1002964.

85. Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, Steiner K, Tam PP, Monaco AP, Willard HF, Koopman P. The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. Hum Mol Genet. 1998;7:737-42.

86. Sengoku T, Yokoyama S. Structural basis for histone H3 Lys 27 demethylation by UTX/KDM6A. Genes Dev. 2011; 25: 2266-77.

87. Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. Nature. 2007;449:731-4.

88. Shpargel KB, Starmer J, Wang C, Ge K, Magnuson T. UTX-guided neural crest function underlies craniofacial features of Kabuki syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114:E9046-E9055.

89. Kato H, Asamitsu K, Sun W, Kitajima S, Yoshizawa-Sugata N, Okamoto T, Masai H, Poellinger L. Cancer-derived UTX TPR mutations G137V and D336G impair interaction with MLL3/4 complexes and affect UTX subcellular localization. Oncogene. 2020;39:3322-3335.

90. Wang SP, Tang Z, Chen CW, Shimada M, Koche RP, Wang LH, Nakadai T, Chramiec A, Krivtsov AV, Armstrong SA, Roeder RG. A UTX-MLL4-p300 Transcriptional Regulatory

Network Coordinately Shapes Active Enhancer Landscapes for Eliciting Transcription. Mol Cell. 2017;67:308-321.e6.

91. Tie F, Banerjee R, Conrad PA, Scacheri PC, Harte PJ. Histone demethylase UTX and chromatin remodeler BRM bind directly to CBP and modulate acetylation of histone H3 lysine 27. Mol Cell Biol. 2012;32:2323-34.

92. Miller SA, Mohn SE, Weinmann AS. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. Mol Cell. 2010;40:594-605.

93. Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstine JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. Nature. 2007;449:689-94.

94. Wang C, Lee JE, Cho YW, Xiao Y, Jin Q, Liu C, Ge K. UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:15324-9.

95. Welstead GG, Creyghton MP, Bilodeau S, Cheng AW, Markoulaki S, Young RA, Jaenisch R. X-linked H3K27me3 demethylase Utx is required for embryonic development in a sex-specific manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:13004-9.

96. Kartikasari AE, Zhou JX, Kanji MS, Chan DN, Sinha A, Grapin-Botton A, Magnuson MA, Lowry WE, Bhushan A. The histone demethylase Jmjd3 sequentially associates with the transcription factors Tbx3 and Eomes to drive endoderm differentiation. EMBO J. 2013;32:1393-408.

97. Ohtani K, Zhao C, Dobreva G, Manavski Y, Kluge B, Braun T, Rieger MA, Zeiher AM, Dimmeler S. Jmjd3 controls mesodermal and cardiovascular differentiation of embryonic stem cells. Circ Res. 2013;113:856-62.

98. De Santa F, Narang V, Yap ZH, Tusi BK, Burgold T, Austenaa L, Bucci G, Caganova M, Notarbartolo S, Casola S, Testa G, Sung WK, Wei CL, Natoli G. Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. EMBO J. 2009;28:3341-52.

99. Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, Miyake T, Matsushita K, Okazaki T, Saitoh T, Honma K, Matsuyama T, Yui K, Tsujimura T, Standley DM, Nakanishi K, Nakai K, Akira S. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. Nat Immunol. 2010;11:936-44.

100. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:11963-8.

101. Anderton JA, Bose S, Vockerodt M, Vrzalikova K, Wei W, Kuo M, Helin K, Christensen J, Rowe M, Murray PG, Woodman CB. The H3K27me3 demethylase, KDM6B, is induced by Epstein-Barr virus and over-expressed in Hodgkin's Lymphoma. Oncogene. 2011;30:2037-43.

102 Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8:a019505.

103. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 1983;301:89-92.

104. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science. 2003;300:455.

105. Rodić N, Sharma R, Sharma R, Zampella J, Dai L, Taylor MS, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Torbenson MS, Goggins M, Shih IeM, Duffield AS, Montgomery EA, Gabrielson E, Netto GJ, Lotan TL, De Marzo AM, Westra W, Binder ZA, Orr BA, Gallia GL, Eberhart CG, Boeke JD, Harris CR, Burns KH. Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. Am J Pathol. 2014;184:1280-6.

106. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. Cancer Res. 2002;62:6442-6.

107. Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. Hum Genet. 1989;83:155-8.

108. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarra JR, Linehan WM, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:9700-4.

109. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet. 2005;37:391-400.

110. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. Br J Cancer. 2008;98:604-10.

111. Krusche CA, Wülfing P, Kersting C, Vloet A, Böcker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. Breast Cancer Res Treat. 2005;90:15-23.

112. Weichert W, Röske A, Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. Clin Cancer Res. 2008;14:1669-77.

113. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, Dietel M, Denkert C, Röcken C. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. Lancet Oncol. 2008;9:139-48.

114. Osada H, Tatematsu Y, Saito H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. Int J Cancer. 2004;112:26-32.

115. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. Oncogene. 2007;26:5420-32.

116. Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. Cancer Res. 2002;62:6456-61.

117. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptordependent transcription. Nature. 2005;437:436-9.

118. Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schüle R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. Cancer Res. 2009;69:2065-71.

119. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature. 2002;419:624-9.

120. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. J Clin Oncol. 2006;24:268-73.

121. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(:11606-11.

122. Guo J, Cai J, Yu L, Tang H, Chen C, Wang Z. EZH2 regulates expression of p57 and contributes to progression of ovarian cancer in vitro and in vivo. Cancer Sci. 2011;102:530-9.

123. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. EMBO J. 2003;22:5323-35.

124. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, Yap D, Humphries RK, Griffith OL, Shah S, Zhu H, Kimbara M, Shashkin P, Charlot JF, Tcherpakov M, Corbett R, Tam A, Varhol R, Smailus D, Moksa M, Zhao Y, Delaney A, Qian H, Birol I, Schein J, Moore R, Holt R, Horsman DE, Connors JM, Jones S, Aparicio S, Hirst M, Gascoyne RD, Marra MA. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat Genet. 2010;42:181-5.

125. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, Marquez VE, Marra MA, Gascoyne RD, Humphries RK, Arrowsmith CH, Morin GB, Aparicio SA. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. Blood. 2011;117:2451-9.

126. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, Chen SB, Della Pietra A 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:2989-94.

127. Chang CJ, Yang JY, Xia W, Chen CT, Xie X, Chao CH, Woodward WA, Hsu JM, Hortobagyi GN, Hung MC. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1-β-catenin signaling. Cancer Cell. 2011;19:86-100.

128. Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani RS, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Yu J, Kleer CG, Varambally S, Chinnaiyan AM. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. Oncogene. 2008;27:7274-84.

129. Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Mönch K, Minucci S, Porse BT, Marine JC, Hansen KH, Helin K. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. Genes Dev. 2007;21:525-30.

130. Lu C, Han HD, Mangala LS, Ali-Fehmi R, Newton CS, Ozbun L, Armaiz-Pena GN, Hu W, Stone RL, Munkarah A, Ravoori MK, Shahzad MM, Lee JW, Mora E, Langley RR, Carroll AR, Matsuo K, Spannuth WA, Schmandt R, Jennings NB, Goodman BW, Jaffe RB, Nick AM, Kim HS, Guven EO, Chen YH, Li LY, Hsu MC, Coleman RL, Calin GA, Denkbas EB, Lim JY, Lee JS, Kundra V, Birrer MJ, Hung MC, Lopez-Berestein G, Sood AK. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. Cancer Cell. 2010;18:185-97.

131. Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Li R, Zhang Y. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. Molecular and cellular biology. 2007;27:5105-19.

132. Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RM, Liou YC, Yu Q. Context-specific regulation of NF-κB target gene expression by EZH2 in breast cancers. Molecular cell. 2011;43:798-810.

133. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, Xu H. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycombindependent. Science. 2012;338:1465-9.

134. Kim JE, Patel M, Ruzevick J, Jackson CM, Lim M. STAT3 activation in glioblastoma: biochemical and therapeutic implications. Cancers. 2014;6:376-95.

135. Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rheey J, Nakano I, Lee C. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Cancer cell. 2013;23:839-52.

136. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, Hochhaus A, Drexler HG, Duncombe A, Cervantes F, Oscier D, Boultwood J, Grand FH, Cross NC. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet. 2010;42:722-6.

137. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2010;42:665-7.

138. Wang Y, Hou N, Cheng X, Zhang J, Tan X, Zhang C, Tang Y, Teng Y, Yang X. Ezh2 Acts as a Tumor Suppressor in Kras-driven Lung Adenocarcinoma. Int J Biol Sci. 2017;13:652-659.

139. van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, Butler A, Hinton J, Latimer C, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Cole J, Forbes S, Jia M, Jones D, Kok CY, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maquire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, Pleasance E, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Collins VP, Ichimura K, Law S, Wong J, Yuen ST, Leung SY, Tonon G, DePinho RA, Tai YT, Anderson KC, Kahnoski RJ, Massie A, Khoo SK, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. Nat Genet. 2009;41:521-3.

140. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. Nature. 2013;502:333-339.

141. Ler LD, Ghosh S, Chai X, Thike AA, Heng HL, Siew EY, Dey S, Koh LK, Lim JQ, Lim WK, Myint SS, Loh JL, Ong P, Sam XX, Huang D, Lim T, Tan PH, Nagarajan S, Cheng CW, Ho H, Ng LG, Yuen J, Lin PH, Chuang CK, Chang YH, Weng WH, Rozen SG, Tan P, Creasy CL, Pang ST, McCabe MT, Poon SL, Teh BT. Loss of tumor suppressor KDM6A amplifies PRC2-regulated transcriptional repression in bladder cancer and can be targeted through inhibition of EZH2. Sci Transl Med. 2017;9:eaai8312.

142. Wu Q, Tian Y, Zhang J, Tong X, Huang H, Li S, Zhao H, Tang Y, Yuan C, Wang K, Fang Z, Gao L, Hu X, Li F, Qin Z, Yao S, Chen T, Chen H, Zhang G, Liu W, Sun Y, Chen L, Wong KK, Ge K, Chen L, Ji H. In vivo CRISPR screening unveils histone demethylase UTX as an important epigenetic regulator in lung tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115:E3978-E3986.

143. Watanabe S, Shimada S, Akiyama Y, Ishikawa Y, Ogura T, Ogawa K, Ono H, Mitsunori Y, Ban D, Kudo A, Yamaoka S, Tanabe M, Tanaka S. Loss of KDM6A characterizes a poor prognostic subtype of human pancreatic cancer and potentiates HDAC inhibitor lethality. Int J Cancer. 2019;145:192-205.

144. Zheng L, Xu L, Xu Q, Yu L, Zhao D, Chen P, Wang W, Wang Y, Han G, Chen CD. Utx loss causes myeloid transformation. Leukemia. 2018;32:1458-1465.

145. Ezponda T, Dupéré-Richer D, Will CM, Small EC, Varghese N, Patel T, Nabet B, Popovic R, Oyer J, Bulic M, Zheng Y, Huang X, Shah MY, Maji S, Riva A, Occhionorelli M, Tonon G, Kelleher N, Keats J, Licht JD. UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 inhibition. Cell Rep. 2017;21:628-640.

146. Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, Rondou P, Rosen M, Pieters T, Vandenberghe P, Delabesse E, Lammens T, De Moerloose B, Menten B, Van Roy N, Verhasselt B, Poppe B, Benoit Y, Taghon T, Melnick AM, Speleman F, Wendel HG, Van Vlierberghe P. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015;125:13-21.

147. Xie G, Liu X, Zhang Y, Li W, Liu S, Chen Z, Xu B, Yang J, He L, Zhang Z, Jin T, Yi X, Sun L, Shang Y, Liang J. UTX promotes hormonally responsive breast carcinogenesis through feed-forward transcription regulation with estrogen receptor. Oncogene. 2017;36:5497-5511.

148. Benyoucef A, Palii CG, Wang C, Porter CJ, Chu A, Dai F, Tremblay V, Rakopoulos P, Singh K, Huang S, Pflumio F, Hébert J, Couture JF, Perkins TJ, Ge K, Dilworth FJ, Brand M. UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia. Genes Dev. 2016;30:508-21.

149. Park WY, Hong BJ, Lee J, Choi C, Kim MY. H3K27 Demethylase JMJD3 Employs the NF-κB and BMP Signaling Pathways to Modulate the Tumor Microenvironment and Promote Melanoma Progression and Metastasis. Cancer Res. 2016;76:161-70.

150. McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Münger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108:2130-5.

151. Ohguchi H, Harada T, Sagawa M, Kikuchi S, Tai YT, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. KDM6B modulates MAPK pathway mediating multiple myeloma cell growth and survival. Leukemia. 2017;31:2661-2669.

152. Ntziachristos P, Tsirigos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L, Loizou E, Holmfeldt L, Strikoudis A, King B, Mullenders J, Becksfort J, Nedjic J, Paietta E, Tallman MS, Rowe JM, Tonon G, Satoh T, Kruidenier L, Prinjha R, Akira S, Van Vlierberghe P, Ferrando AA, Jaenisch R, Mullighan CG, Aifantis I. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. Nature. 2014;514:513-7.

153. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Matsusaka K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M, Koike K. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBPα. Carcinogenesis. 2014;35:2404-14.

154. Yang L, Zha Y, Ding J, Ye B, Liu M, Yan C, Dong Z, Cui H, Ding HF. Histone demethylase KDM6B has an anti-tumorigenic function in neuroblastoma by promoting differentiation. Oncogenesis. 2019;8:3.

155. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. Cell. 1993;73:1059-65.

156. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. 1999;13:1501-12.

157. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. Oncogene. 2006;25:5220-7.

158. Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J, Eilers M. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. EMBO J. 1999;18:5321-33.

159. Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. Nature. 1996;384:470-4.

160. Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjan B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J, Sukumar S. Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. Cancer Res. 2001;61:2782-7.

161. Yu J, Leung WK, Ebert MP, Leong RW, Tse PC, Chan MW, Bai AH, To KF, Malfertheiner P, Sung JJ. Absence of cyclin D2 expression is associated with promoter hypermethylation in gastric cancer. Br J Cancer. 2003;88:1560-5.

162. Virmani A, Rathi A, Heda S, Sugio K, Lewis C, Tonk V, Takahashi T, Roth JA, Minna JD, Euhus DM, Gazdar AF. Aberrant methylation of the cyclin D2 promoter in primary small cell, nonsmall cell lung and breast cancers. Int J Cancer. 2003;107:341-5.

163. Meyyappan M, Wong H, Hull C, Riabowol KT. Increased expression of cyclin D2 during multiple states of growth arrest in primary and established cells. Mol Cell Biol. 1998;18:3163-72.

164. Mermelshtein A, Gerson A, Walfisch S, Delgado B, Shechter-Maor G, Delgado J, Fich A, Gheber L. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas. Br J Cancer. 2005;93:338-45.

165. Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I. Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. Am J Pathol. 2000;156:585-94.

166. Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36:1161-5.

167. Finnson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2:195-214.

168. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8:a021873.

169. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. Mediators Inflamm. 2015;2015:137823.

170. Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. J Biol Chem. 2005;280:7409-12.

171. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. Latent TGF-β-binding proteins. Matrix Biol. 2015;47:44-53.

172. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- β function. J Biochem. 2012;152:321-9.

173. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. Matrix Biol. 2015;47:54-65.

174. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. Genes Dev. 2000;14:163-76.

175. G Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. J Cell Biol. 2006;175:111-20.

176. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013;2:47-63.

177. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature. 1994;370:341-7.

178. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:659-93.

179. Wrana JL, Attisano L. The Smad pathway. Cytokine Growth Factor Rev. 2000;11:5-13.

180. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8:970-82.

181. Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. Int J Biochem Cell Biol. 2008;40:383-408.

182. Hill CS. Transcriptional Control by the SMADs. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8:a022079.

183. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell. 1997;89:1165-73.

184. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. Mol Cell. 2000;6:1365-75.

185. Mulder KM, Morris SL. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. J Biol Chem. 1992;267:5029-31.

186. Galliher AJ, Schiemann WP. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. Cancer Res. 2007;67:3752-8.

187. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. J Biol Chem. 2000;275:36803-10.

188. Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. J Cell Biol. 2007;178:437-51.

189. Lebrun JJ. The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. ISRN Mol Biol. 2012;2012:381428.

190. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. Int J Biol Sci. 2018;14:111-123.

191. Grau AM, Zhang L, Wang W, Ruan S, Evans DB, Abbruzzese JL, Zhang W, Chiao PJ. Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor beta involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer Res. 1997;57:3929-34.

192. Hunt KK, Fleming JB, Abramian A, Zhang L, Evans DB, Chiao PJ. Overexpression of the tumor suppressor gene Smad4/DPC4 induces p21waf1 expression and growth inhibition in human carcinoma cells. Cancer Res. 1998;58:5656-61.

193. Lecanda J, Ganapathy V, D'Aquino-Ardalan C, Evans B, Cadacio C, Ayala A, Gold LI. TGFbeta prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest. Cell Cycle. 2009;8:742-56.

194. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. Nat Cell Biol. 2002;4:51-8.

195. Korah J, Falah N, Lacerte A, Lebrun JJ. A transcriptionally active pRb-E2F1-P/CAF signaling pathway is central to TGF β -mediated apoptosis. Cell Death Dis. 2012;3:e407.

196. Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. Mol Med Today. 1998;4:257-62.

197. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2006;17:41-58.

198. Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G, ten Dijke P. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. Cancer Res. 2006;66:2202-9.

199. Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Porter Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM, Kuntz KW, Keilhack H. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:7922-7.

200. Knutson SK, Kawano S, Minoshima Y, Warholic NM, Huang KC, Xiao Y, Kadowaki T, Uesugi M, Kuznetsov G, Kumar N, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, Waters NJ, Smith JJ, Porter-Scott M, Chesworth R, Moyer MP, Copeland RA, Richon VM, Uenaka T,

Pollock RM, Kuntz KW, Yokoi A, Keilhack H. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. Mol Cancer Ther. 2014;13:842-54.

201. Chan-Penebre E, Armstrong K, Drew A, Grassian AR, Feldman I, Knutson SK, Kuplast-Barr K, Roche M, Campbell J, Ho P, Copeland RA, Chesworth R, Smith JJ, Keilhack H, Ribich SA. Selective Killing of SMARCA2- and SMARCA4-deficient Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcemic Type Cells by Inhibition of EZH2: In Vitro and In Vivo Preclinical Models. Mol Cancer Ther. 2017;16:850-860.

202. Gartin AK, Frost TC, Cushman CH, Leeper BA, Gokhale PC, DeCaprio JA. Merkel Cell Carcinoma Sensitivity to EZH2 Inhibition Is Mediated by SIX1 Derepression. J Invest Dermatol. 2022:S0022-202X(22)00206-8.

203. Passeri T, Dahmani A, Masliah-Planchon J, Naguez A, Michou M, El Botty R, Vacher S, Bouarich R, Nicolas A, Polivka M, Franck C, Schnitzler A, Némati F, Roman-Roman S, Bourdeaut F, Adle-Biassette H, Mammar H, Froelich S, Bièche I, Decaudin D. Dramatic In Vivo Efficacy of the EZH2-Inhibitor Tazemetostat in PBRM1-Mutated Human Chordoma Xenograft. Cancers (Basel). 2022;14:1486.

204. U.S. Food & Drug Administration. FDA granted accelerated approval to tazemetostat for follicular lymphoma [Internet]. Silver Spring, Maryland, SAD: U.S. Food & Drug Administration; 2020 August [cited 2022 December 12]. Available from: https://www.fda.gov/drugs/fda-granted-accelerated-approval-tazemetostat-follicular-lymphoma

205. Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, Eberhard D, Hutchinson S, Jones E, Katso R, Leveridge M, Mander PK, Mosley J, Ramirez-Molina C, Rowland P, Schofield CJ, Sheppard RJ, Smith JE, Swales C, Tanner R, Thomas P, Tumber A, Drewes G, Oppermann U, Patel DJ, Lee K, Wilson DM. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. Nature. 2012;488:404-8.

206. Kruidenier L, Chung CW, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G, Bantscheff M, Bountra C, Bridges A, Diallo H, Eberhard D, Hutchinson S, Jones E, Katso R, Leveridge M, Mander PK, Mosley J, Ramirez-Molina C, Rowland P, Schofield CJ, Sheppard RJ, Smith JE, Swales C, Tanner R, Thomas P, Tumber A, Drewes G, Oppermann U, Patel DJ, Lee K, Wilson DM. Kruidenier et al. reply. Nature. 2014;514, E2-E2.

207. Heinemann B, Nielsen JM, Hudlebusch HR, Lees MJ, Larsen DV, Boesen T, Labelle M, Gerlach LO, Birk P, Helin K. Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. Nature. 2014;514:E1-2.

208. Lin B, Lu B, Hsieh IY, Liang Z, Sun Z, Yi Y, Lv W, Zhao W, Li J. Synergy of GSK-J4 With Doxorubicin in KRAS-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer. Front Pharmacol. 2020;11:632.

209. Hong BJ, Park WY, Kim HR, Moon JW, Lee HY, Park JH, Kim SK, Oh Y, Roe JS, Kim MY. Oncogenic KRAS Sensitizes Lung Adenocarcinoma to GSK-J4-Induced Metabolic and Oxidative Stress. Cancer Res. 2019;79:5849-5859.

210. Romero OA, Vilarrubi A, Alburquerque-Bejar JJ, Gomez A, Andrades A, Trastulli D, Pros E, Setien F, Verdura S, Farré L, Martín-Tejera JF, Llabata P, Oaknin A, Saigi M, Piulats JM, Matias-Guiu X, Medina PP, Vidal A, Villanueva A, Sanchez-Cespedes M. SMARCA4 deficient tumours are vulnerable to KDM6A/UTX and KDM6B/JMJD3 blockade. Nat Commun. 2021;12:4319.

211. Li Y, Zhang M, Sheng M, Zhang P, Chen Z, Xing W, Bai J, Cheng T, Yang FC, Zhou Y. Therapeutic potential of GSK-J4, a histone demethylase KDM6B/JMJD3 inhibitor, for acute myeloid leukemia. J Cancer Res Clin Oncol. 2018;144:1065-1077.

212. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anticancer Agents Med Chem. 2007;7:3-18.

213. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14298-302.

214. Pinto AL, Lippard SJ. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. Biochim Biophys Acta. 1985;780:167-80.

215. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur J Pharmacol. 2014;740:364-78.

216. Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. Crit Rev Toxicol. 2010;40:347-59.

217. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. J Pharm Sci. 2007;96:2181-96.

218. Sawayama H, Ogata Y, Ishimoto T, Mima K, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. Glucose transporter 1 regulates the proliferation and cisplatin sensitivity of esophageal cancer. Cancer Sci. 2019;110:1705-1714.

219. Xu Y, Gao W, Zhang Y, Wu S, Liu Y, Deng X, Xie L, Yang J, Yu H, Su J, Sun L. ABT737 reverses cisplatin resistance by targeting glucose metabolism of human ovarian cancer cells. Int J Oncol. 2018;53:1055-1068.

220. Catanzaro D, Gaude E, Orso G, Giordano C, Guzzo G, Rasola A, Ragazzi E, Caparrotta L, Frezza C, Montopoli M. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase sensitizes cisplatin-resistant cells to death. Oncotarget. 2015;6:30102-14.

221. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. Cancers (Basel). 2011;3:1351-71.

222. Chovanec M, Abu Zaid M, Hanna N, El-Kouri N, Einhorn LH, Albany C. Long-term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors. Ann Oncol. 2017;28:2670-79.

223. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene. 2012;31:1869-83.

224. Chen SH, Chang JY. New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. Int J Mol Sci. 2019;20:4136.

225. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. Cancers (Basel). 2014;6:1769-92.

226. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. Pharmacol Rev. 2012;64:706-21.

227. Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. Cancer. 1972;29:117-21.

228. Peterson WD Jr, Stulberg CS, Simpson WF. A permanent heteroploid human cell line with type B glucose-6-phosphate dehydrogenase. Proc Soc Exp Biol Med. 1971;136:1187-91.

229. Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In: Fogh J, editor. Human tumor cells in vitro. Boston, USA. Springer; 1975. p. 115-159.

230. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

231. Samaržija I, Tomljanović M, Novak Kujundžić R, Trošelj KG. EZH2 Inhibition and Cisplatin as a Combination Anticancer Therapy: An Overview of Preclinical Studies. Cancers (Basel). 2022;14:4761.

232. Singh R, Fazal Z, Corbet AK, Bikorimana E, Rodriguez JC, Khan EM, Shahid K, Freemantle SJ, Spinella MJ. Epigenetic Remodeling through Downregulation of Polycomb Repressive Complex 2 Mediates Chemotherapy Resistance in Testicular Germ Cell Tumors. Cancers (Basel). 2019;11:796.

233. He C, Sun J, Liu C, Jiang Y, Hao Y. Elevated H3K27me3 levels sensitize osteosarcoma to cisplatin. Clin Epigenetics. 2019;11:8.

234. Huang Y, Wang X, Niu X, Wang X, Jiang R, Xu T, Liu Y, Liang L, Ou X, Xing X, Li W, Hu C. EZH2 suppresses the nucleotide excision repair in nasopharyngeal carcinoma by silencing XPA gene. Mol Carcinog. 2017;56:447-463.

235. Watarai H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Suzuki S, Seino S, Oizumi H, Sadahiro M, Kitanaka C. Impact of H3K27 Demethylase Inhibitor GSKJ4 on NSCLC Cells Alone and in Combination with Metformin. Anticancer Res. 2016;36:6083-92.

236. Lhuissier E, Aury-Landas J, Allas L, Boittin M, Boumediene K, Baugé C. Antiproliferative effect of the histone demethylase inhibitor GSK-J4 in chondrosarcomas. IUBMB Life. 2019;71:1711-19.

237. Pinton G, Nilsson S, Moro L. Targeting estrogen receptor beta (ER β) for treatment of ovarian cancer: importance of KDM6B and SIRT1 for ER β expression and functionality. Oncogenesis. 2018;7:15.

238. Köberle B, Schoch S. Platinum Complexes in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. Cancers (Basel). 2021;13:2073.

239. Morel D, Jeffery D, Aspeslagh S, Almouzni G, Postel-Vinay S. Combining epigenetic drugs with other therapies for solid tumours - past lessons and future promise. Nat Rev Clin Oncol. 2020;17:91-107.

240. Ganesan A, Arimondo PB, Rots MG, Jeronimo C, Berdasco M. The timeline of epigenetic drug discovery: from reality to dreams. Clin Epigenetics. 2019;11:174.

241. Strojan P, Vermorken JB, Beitler JJ, Saba NF, Haigentz M Jr, Bossi P, Worden FP, Langendijk JA, Eisbruch A, Mendenhall WM, Lee AW, Harrison LB, Bradford CR, Smee R, Silver CE, Rinaldo A, Ferlito A. Cumulative cisplatin dose in concurrent chemoradiotherapy for head and neck cancer: A systematic review. Head Neck. 2016;38 Suppl 1:E2151-8.

242. Comella P, Casaretti R, Sandomenico C, Avallone A, Franco L. Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. Ther Clin Risk Manag. 2009;5:229-38.

243. Rajkumar P, Mathew BS, Das S, Isaiah R, John S, Prabha R, Fleming DH. Cisplatin Concentrations in Long and Short Duration Infusion: Implications for the Optimal Time of Radiation Delivery. J Clin Diagn Res. 2016;10:XC01-XC04.

244. Huang X, Yan J, Zhang M, Wang Y, Chen Y, Fu X, Wei R, Zheng XL, Liu Z, Zhang X, Yang H, Hao B, Shen YY, Su Y, Cong X, Huang M, Tan M, Ding J, Geng M. Targeting Epigenetic Crosstalk as a Therapeutic Strategy for EZH2-Aberrant Solid Tumors. Cell. 2018;175:186-199.e19.

245. Brach D, Johnston-Blackwell D, Drew A, Lingaraj T, Motwani V, Warholic NM, Feldman I, Plescia C, Smith JJ, Copeland RA, Keilhack H, Chan-Penebre E, Knutson SK, Ribich SA, Raimondi A, Thomenius MJ. EZH2 Inhibition by Tazemetostat Results in Altered Dependency on B-cell Activation Signaling in DLBCL. Mol Cancer Ther. 2017;16:2586-2597.

246. Cai L, Wang Z, Liu D. Interference with endogenous EZH2 reverses the chemotherapy drug resistance in cervical cancer cells partly by up-regulating Dicer expression. Tumour Biol. 2016;37:6359-69.

247. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65:55-63.

248. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. Colloids Surf B Biointerfaces. 2005;45:108-11.

249. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, Soni R, Dwarakanath BS, Bhatt AN. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. Sci Rep. 2018;8:1531.

250. Kleih M, Böpple K, Dong M, Gaißler A, Heine S, Olayioye MA, Aulitzky WE, Essmann F. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells. Cell Death Dis. 2019;10:851.

251. Milković L, Tomljanović M, Čipak Gašparović A, Novak Kujundžić R, Šimunić D, Konjevoda P, Mojzeš A, Đaković N, Žarković N, Gall Trošelj K. Nutritional Stress in Head

and Neck Cancer Originating Cell Lines: The Sensitivity of the NRF2-NQO1 Axis. Cells. 2019;8:1001.

252. Wagner U, Burkhardt E, Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the 3H-thymidine incorporation assay. Vet Immunol Immunopathol. 1999;70:151-9.

253. Yao X, Watkins NH, Brown-Harding H, Bierbach U. A membrane transporter determines the spectrum of activity of a potent platinum-acridine hybrid anticancer agent. Sci Rep. 2020;10:15201.

254. Govaert E, Van Steendam K, Scheerlinck E, Vossaert L, Meert P, Stella M, Willems S, De Clerck L, Dhaenens M, Deforce D. Extracting histones for the specific purpose of label-free MS. Proteomics. 2016;16:2937-2944.

255. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011;731:237-45.

256. Tao T, Chen M, Jiang R, Guan H, Huang Y, Su H, Hu Q, Han X, Xiao J. Involvement of EZH2 in aerobic glycolysis of prostate cancer through miR-181b/HK2 axis. Oncol Rep. 2017;37:1430-1436.

257. Vantaku V, Putluri V, Bader DA, Maity S, Ma J, Arnold JM, Rajapakshe K, Donepudi SR, von Rundstedt FC, Devarakonda V, Dubrulle J, Karanam B, McGuire SE, Stossi F, Jain AK, Coarfa C, Cao Q, Sikora AG, Villanueva H, Kavuri SM, Lotan Y, Sreekumar A, Putluri N. Epigenetic loss of AOX1 expression via EZH2 leads to metabolic deregulations and promotes bladder cancer progression. Oncogene. 2020;39:6265-6285.

258. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene. 2003;22:7265-79.

259. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. J Natl Cancer Inst. 1990;82:749-55.

260. Kudo H, Nakayama T, Mano Y, Suzuki S, Sassa S, Sakamoto S. Early progression from dimethyl sulfoxide-induced G(0)/G(1) arrest in L(1210) cells. Cell Biol Int. 2002;26:211-5.

261. Teraoka H, Mikoshiba M, Takase K, Yamamoto K, Tsukada K. Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: dimethyl sulfoxide inhibits IL-6-induced differentiation of SKW6-CL4 into IgM-secreting plasma cells. Exp Cell Res. 1996;222:218-24.

262. Stazi G, Taglieri L, Nicolai A, Romanelli A, Fioravanti R, Morrone S, Sabatino M, Ragno R, Taurone S, Nebbioso M, Carletti R, Artico M, Valente S, Scarpa S, Mai A. Dissecting the role of novel EZH2 inhibitors in primary glioblastoma cell cultures: effects on proliferation, epithelial-mesenchymal transition, migration, and on the pro-inflammatory phenotype. Clin Epigenetics. 2019;11:173.

263. Chu X, Zhong L, Yu L, Xiong L, Li J, Dan W, Ye J, Liu C, Luo X, Liu B. GSK-J4 induces cell cycle arrest and apoptosis via ER stress and the synergism between GSK-J4 and decitabine in acute myeloid leukemia KG-1a cells. Cancer Cell Int. 2020;20:209.

264. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nat Rev Cancer. 2009;9:400-14.

265. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. Genes Dev. 1997;11:847-62.

266. Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. Cancer Lett. 2002;179:1-14.

267. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta. 2000;1471:M43-56.

268. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. Nat Cell Biol. 2001;3:245-52.

269. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. Genes Dev. 1995;9:935-44.

270. Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumorsuppressor protein p53 by DNA-damaging agents. Oncogene. 1993;8:307-18.

271. Jung YS, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. Cell Signal. 2010;22:1003-12.

272. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:5545-9.

273. Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klein-Szanto AJ. p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. Am J Pathol. 1993;142:1131-9.

274. Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. Oncogene. 2004;23:2330-8.

275. Chiang YT, Chien YC, Lin YH, Wu HH, Lee DF, Yu YL. The Function of the Mutant p53-R175H in Cancer. Cancers (Basel). 2021;13:4088.

276. Lincet H, Poulain L, Remy JS, Deslandes E, Duigou F, Gauduchon P, Staedel C. The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. Cancer Lett. 2000;161:17-26.

277. Dolezalova D, Mraz M, Barta T, Plevova K, Vinarsky V, Holubcova Z, Jaros J, Dvorak P, Pospisilova S, Hampl A. MicroRNAs regulate p21(Waf1/Cip1) protein expression and the DNA damage response in human embryonic stem cells. Stem Cells. 2012;30:1362-72.

278. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. Cancer Res. 1992;52:5997-6000.

279. Ham SW, Jeon HY, Jin X, Kim EJ, Kim JK, Shin YJ, Lee Y, Kim SH, Lee SY, Seo S, Park MG, Kim HM, Nam DH, Kim H. TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. Cell Death Differ. 2019;26:409-425.

280. Boettcher S, Miller PG, Sharma R, McConkey M, Leventhal M, Krivtsov AV, Giacomelli AO, Wong W, Kim J, Chao S, Kurppa KJ, Yang X, Milenkowic K, Piccioni F, Root DE, Rücker FG, Flamand Y, Neuberg D, Lindsley RC, Jänne PA, Hahn WC, Jacks T, Döhner H, Armstrong SA, Ebert BL. A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. Science. 2019;365:599-604.

281. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang TH, Issa JP. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. Nat Genet. 2008;40:741-50.

282. Liu SC, Bassi DE, Zhang SY, Holoran D, Conti CJ, Klein-Szanto AJ. Overexpression of cyclin D2 is associated with increased in vivo invasiveness of human squamous carcinoma cells. Mol Carcinog. 2002;34:131-9.

283. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. Oncogene. 1998;17:1027-37.

284. He LM, Sartori DJ, Teta M, Opare-Addo LM, Rankin MM, Long SY, Diehl JA, Kushner JA. Cyclin D2 protein stability is regulated in pancreatic beta-cells. Mol Endocrinol. 2009;23:1865-75.

285. Zhao Z, Yang F, Liu Y, Fu K, Jing S. MicroRNA-409-3p suppresses cell proliferation and cell cycle progression by targeting cyclin D2 in papillary thyroid carcinoma. Oncol Lett. 2018;16:5237-5242.

286. Li Z, Qin Y, Chen P, Luo Q, Shi H, Jiang X. miR-135b-5p enhances the sensitivity of HER-2 positive breast cancer to trastuzumab via binding to cyclin D2. Int J Mol Med. 2020;46:1514-1524.

287. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. Nucleic Acids Res. 2020;48:D127-D131.

288. Wang Z, Xie Y, Zhang L, Zhang H, An X, Wang T, Meng A. Migratory localization of cyclin D2-Cdk4 complex suggests a spatial regulation of the G1-S transition. Cell Struct Funct. 2008;33:171-83.

289. The Human Protein Atlas. CCND2 - Subcellular [Internet]. Stockholm, Švedska: The Human Protein Atlas; [citirano 2022 December 12]. Dostupno: https://www.proteinatlas.org/ENSG00000118971-CCND2/subcellular

290. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, Alm T, Asplund A, Björk L, Breckels LM, Bäckström A, Danielsson F, Fagerberg L, Fall J, Gatto L, Gnann C, Hober S, Hjelmare M, Johansson F, Lee S, Lindskog C, Mulder J, Mulvey CM, Nilsson P,

Oksvold P, Rockberg J, Schutten R, Schwenk JM, Sivertsson Å, Sjöstedt E, Skogs M, Stadler C, Sullivan DP, Tegel H, Winsnes C, Zhang C, Zwahlen M, Mardinoglu A, Pontén F, von Feilitzen K, Lilley KS, Uhlén M, Lundberg E. A subcellular map of the human proteome. Science. 2017;356:eaal3321.

291. Alao JP, Gamble SC, Stavropoulou AV, Pomeranz KM, Lam EW, Coombes RC, Vigushin DM. The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. Mol Cancer. 2006;5:7.

292. Hou H, Yu R, Zhao H, Yang H, Hu Y, Hu Y, Guo J. LncRNA OTUD6B-AS1 Induces Cisplatin Resistance in Cervical Cancer Cells Through Up-Regulating Cyclin D2 via miR-206. Front Oncol. 2021;11:777220.

293. Xie N, Liu YR, Li YM, Yang YN, Pan L, Wei YB, Wang PY, Li YJ, Xie SY. Cisplatin decreases cyclin D2 expression via upregulating miR-93 to inhibit lung adenocarcinoma cell growth. Mol Med Rep. 2019;20:3355-3362.

294. Hames BD, editor. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. [3rd edition] Oxford: Oxford Unversity Press; 1998.

295. Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. Pac Symp Biocomput. 2002:310-22.

296. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J. 2013;32:1478-88.

297. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM. NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. BMC Bioinformatics. 2009;10:202.

298. Sedek M, Strous GJ. SUMOylation is a regulator of the translocation of Jak2 between nucleus and cytosol. Biochem J. 2013;453:231-9.

299. Hyland PL, McDade SS, McCloskey R, Dickson GJ, Arthur K, McCance DJ, Patel D. Evidence for alteration of EZH2, BMI1, and KDM6A and epigenetic reprogramming in human papillomavirus type 16 E6/E7-expressing keratinocytes. J Virol. 2011;85:10999-1006.

300. Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT, Tarakhovsky A. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. Nat Immunol. 2003;4:124-31.

301. Anwar T, Arellano-Garcia C, Ropa J, Chen YC, Kim HS, Yoon E, Grigsby S, Basrur V, Nesvizhskii AI, Muntean A, Gonzalez ME, Kidwell KM, Nikolovska-Coleska Z, Kleer CG. p38-mediated phosphorylation at T367 induces EZH2 cytoplasmic localization to promote breast cancer metastasis. Nat Commun. 2018;9:2801.

302. Li Z, Li M, Wang D, Hou P, Chen X, Chu S, Chai D, Zheng J, Bai J. Post-translational modifications of EZH2 in cancer. Cell Biosci. 2020;10:143.

303. Huszar JM, Payne CJ. MIR146A inhibits JMJD3 expression and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. FEBS Lett. 2014;588:1850-6.

304. Chen C, Wu M, Zhang W, Lu W, Zhang M, Zhang Z, Zhang X, Yuan Z. MicroRNA-939 restricts Hepatitis B virus by targeting Jmjd3-mediated and C/EBPα-coordinated chromatin remodeling. Sci Rep. 2016;6:35974.

305. Kamikawa YF, Donohoe ME. The localization of histone H3K27me3 demethylase Jmjd3 is dynamically regulated. Epigenetics. 2014;9:834-41.

8. SAŽETAK

Cisplatina se koristi za liječenje velikog broja različitih zloćudnih tumora. Učinkovitost liječenja ograničena je pojavom ozbiljnih neželjenih pojava i/ili zbog otpornosti stanica zloćudnih tumora na liječenje. U posljednjih 18 godina za liječenje zloćudnih tumora koriste se spojevi koji moduliraju epigenom. Epigenetičke promjene su uključene, barem djelomično, u razvoj neosjetljivosti stanica zloćudnih tumora na velik broj protutumorskih lijekova. Važna epigenetička modifikacija koja je uključena u nastanak neosjetljivosti je trimetilacija lizina na položaju 27 u histonu H3 (H3K27me3). Ovu represivnu oznaku uspostavlja enzim EZH2 koji se može selektivno inhibirati lijekom tazemetostatom. Uklanjanje ove oznake kataliziraju enzimi KDM6A i KDM6B koji se mogu inhibirati spojem GSK-J4. Cilj rada bio je istražiti učinak spojeva tazemetostat i GSK-J4, u odnosu na promjenu osjetljivosti stanica na cisplatinu. Model istraživanja bile su stanice podrijetlom od zloćudnih tumora glave i vrata (Detroit 562 i FaDu) i debelog crijeva (HT-29). Kombinacije ovih spojeva s cisplatinom nisu dovoljno, ili uopće, istražene na ovim modelima. Dodatno je istražen učinak ovih spojeva u odnosu na razinu glukoze u hranjivom mediju.

Cisplatina je uzrokovala stanično specifičan odgovor izmjeren primjenom funkcionalnih staničnih testova (test vijabilnosti, test proliferacije). Linija stanica FaDu pokazala se najosjetljivijom na djelovanje cisplatine, Detroit 562 umjereno osjetljivom, dok su stanice HT-29 bile najotpornije. Kombiniranje cisplatine s tazemetostatom nije dovelo do dodatnog povećanja učinka cisplatine na proliferaciju stanica FaDu i Detroit 562, dok je u stanicama zloćudnog tumora debelog crijeva, HT-29, tazemetostat antagnonizirao djelovanje cisplatine. Za razliku od tazemetostata, spoj GSK-J4 sinergistički je djelovao s cisplatinom u odnosu na smanjenje proliferacije stanica Detroit 562 i HT-29. Sinergistički učinak izostao je u stanicama FaDu. Učinci kombinacija spojeva nisu se značajno razlikovali u odnosu na koncentraciju glukoze u mediju. Pozadina opaženih promjena istražila se na molekularno-genetičkoj razini, mjerenjem transkripata i proteinskih produkata gena uključenih u regulaciju staničnog ciklusa. Iako je cisplatina uzrokovala porast transkripta CDKN1A (P21) u svim linijama, u stanicama Detroit 562 i FaDu (ali ne i HT-29) došlo je do sniženja razine P21 u ukupnim proteinima i proteinima citoplazme. Tazemetostat je uzrokovao porast P21 u svim stanicama. Također, primjena tazemetostata, samostalno ili s cisplatinom, uzrokovala je porast transkripta i proteina TGFB1 u stanicama HT-29. Porast se poklapa s povećanom proliferacijom u ovim eksperimentalnim uvjetima.

Ovaj rad poslužiti će kao osnova za dodatna istraživanja kojima će se ispitati mogućnost inhibicije enzima KDM6A i KDM6B u kombinaciji s cisplatinom, u pretkliničkim modelima. Također, ovo istraživanje pokazalo je i potencijalno opasne učinke tazemetostata u slučaju primjene na bolesnicima koji imaju karcinom debelog crijeva.

9. SUMMARY

Cisplatin is used to treat a number of various malignant tumors. The effectiveness of the treatment is limited by the occurrence of serious side effects and/or the cancer cells develop resistance to the treatment. Over the last 18 years, epigenome modulating compounds have been used to treat cancer. Epigenetic changes are involved, at least in part, in the development of cancer cell resistance to a number of antitumor drugs. An important epigenetic mark which is involved in development of resistance is trimethylation of lysine at the position 27 in histone H3 (H3K27me3). This repressive mark is established by the enzyme EZH2, which can be selectively inhibited by the drug tazemetostat. The removal of this mark is catalyzed by the enzymes KDM6A and KDM6B, which can be inhibited by the compound GSK-J4. The aim of this work was exploration of the effect of tazemetostat and GSK-J4, on sensitivity of cancer cells to cisplatin. The research was conducted using cells originating from head and neck (Detroit 562 and FaDu) and colon malignant tumors (HT-29). Combinations of tazemetostat and GSK-J4 with cisplatin have not been sufficiently, if at all, investigated in these models. Additionally, the effect of these compounds in relation to the content of glucose in the nutrient medium was investigated.

The cellular response to cisplatin was cell-type specific and was measured with functional cellular assays (viability assay, proliferation assay). FaDu cell line proved to be the most sensitive to cisplatin, Detroit 562 was moderately sensitive, while HT-29 cells were the most resistant. Combining cisplatin with tazemetostat did not increase the effect of cisplatin with respect to the rate of FaDu and Detroit 562 proliferation, while in colon cancer cells, HT-29, tazemetostat antagonized the effect of cisplatin. Contrary to tazemetostat, the compound GSK-J4 exerted synergistic effect with cisplatin, which was obvious through the reduced proliferation rate of Detroit 562 and HT-29 cells. This effect was absent in FaDu cell lines. The effects of combined treatments did not differ significantly regarding the concentration of glucose in the medium. The underlying causes of the changes observed were investigated at the molecular-genetic level, by measuring the transcriptional activity, as well as the protein level of the selected genes involved in the regulation of the cell cycle and their protein products. Cisplatin application was associated with an increase of CDKNIA (P21) transcription in all cell lines. However, in Detroit 562 and FaDu, it was joined with a decrease of the P21 protein in both the total proteins and in the cytoplasmic protein fraction. This decrease was not observed in HT-29 cells. Tazemetostat caused an increase of P21 in all cell lines. Also, administration of tazemetostat, whether alone or in combination with cisplatin, caused an increase of TGFB1
HT-29 cells, on both, transcriptional and protein level. This increase coincides with increased proliferation under these specific experimental conditions.

This work will serve as the basis for additional research that will explore the possibility of combining inhibition of enzymes KDM6A and KDM6B with cisplatin application, in preclinical cancer models. This *in vitro* research showed the potentially dangerous side effects of tazemetostat should it be used in patients with colon cancer.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 6. studenog 1991. godine u Našicama, u kojima sam završio osnovnu školu i Opću gimnaziju. Diplomirao sam na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu godine 2015. i stekao akademski naziv magistra farmacije.

Tijekom godine 2016. bio sam na stručom stažu. Slijedeće godine sam položio stručni ispit pred ispitnim povjerenstvom Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske i stekao odobrenje Hrvatske ljekarničke komore za samostalni rad.

Godine 2018. počeo sam raditi kao asistent u Laboratoriju za epigenomiku, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković. Iste godine sam upisao Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković.

Dobitnik sam Rektorove nagrade za akademsku godinu 2014/2015. Autor sam i koautor osam znanstvenih članaka u časopisima indeksiranim u bazi Web of Science Core Collection. Sudjelovao sam, kao koautor, na četiri međunarodna skupa s izlaganjima, sažeci kojih su objavljeni u časopisima s međunarodnim recenzijama.

11. POPIS PUBLIKACIJA

ZNANSTVENI RADOVI

1. Samaržija I, <u>Tomljanović M</u>, Novak Kujundžić R, Gall Trošelj K. EZH2 Inhibition and Cisplatin as a Combination Anticancer Therapy: An Overview of Preclinical Studies. Cancers (Basel). 2022;14:4761.

2. Gall Trošelj K, <u>Tomljanović M</u>, Jaganjac M, Matijević Glavan T, Čipak Gašparović A, Milković L, Borović Šunjić S, Buttari B, Profumo E, Saha S, Saso L. Oxidative Stress and Cancer Heterogeneity Orchestrate NRF2 Roles Relevant for Therapy Response. Molecules. 2022;27:1468.

3. Novak Kujundžić R, Prpić M, Đaković N, Dabelić N, <u>Tomljanović M</u>, Mojzeš A, Fröbe A, Gall Trošelj K. Nicotinamide N-Methyltransferase in Acquisition of Stem Cell Properties and Therapy Resistance in Cancer. Int J Mol Sci. 2021;22:5681.

4. Gall Trošelj K, Samaržija I, <u>Tomljanović M</u>, Novak Kujundžić R, Đaković N, Mojzeš A. Implementing Curcumin in Translational Oncology Research. Molecules. 2020;25:5240.

5. Mojzeš A, <u>Tomljanović M</u>, Milković L, Novak Kujundžić R, Čipak Gašparović A, Gall Trošelj K. Cell-Type Specific Metabolic Response of Cancer Cells to Curcumin. Int J Mol Sci. 2020;21:1661.

6. Milković L, <u>Tomljanović M</u>, Čipak Gašparović A, Novak Kujundžić R, Šimunić D, Konjevoda P, Mojzeš A, Đaković N, Žarković N, Gall Trošelj K. Nutritional Stress in Head and Neck Cancer Originating Cell Lines: The Sensitivity of the NRF2-NQO1 Axis. Cells. 2019;8:1001.

7. Rodrigues C, Milković L, Bujak IT, <u>Tomljanović M</u>, Soveral G, Čipak Gašparović A. Lipid Profile and Aquaporin Expression under Oxidative Stress in Breast Cancer Cells of Different Malignancies. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:2061830.

8. Novak Kujundžić R, Stepanić V, Milković L, Čipak Gašparović A, <u>Tomljanović M</u>, Gall Trošelj K. Curcumin and its Potential for Systemic Targeting of Inflamm-Aging and Metabolic Reprogramming in Cancer. Int J Mol Sci. 2019;20:1180.

SUDJELOVANJA NA SKUPOVIMA

1. Zlendić M, Vrbanović E, Gall Trošelj K, <u>Tomljanović M</u>, Alajbeg I. Association of Specific Genes Polymorphisms With Temporomandibular Disorders. 2022 AADOCR/CADR Annual Meeting; 2022, 21-26 ožujka; Atlanta, Georgia, SAD.

2. Zlendić M, Vrbanović E, Gall Trošelj K, <u>Tomljanović M</u>, Alajbeg I. Metoda izdvajanja DNK na zavodu za mobilnu protetiku Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. U: Klarić Sever E, urednik. 7th International Congress of the School of Dental Medicine University of Zagreb; 2021, 21-22 svibnja; Rovinj, Hrvatska.

3. Mojzeš A, Novak Kujundžić R, Milković L, <u>Tomljanović M</u>, Čipak Gašparović A, Konjevoda P, Gall Trošelj K. Epigenetic regulation of NRF2-NQO1 axis in human head and neck-originating cancer cell lines and untransformed fibroblasts exposed to nutritional stress. U: Alexandrov T, Ladurner A, Mellor J, Pearce E, urednici . Metabolism Meets Epigenetics; 2019, 20-23 studeni; Heidelberg, Njemačka .

4. <u>Tomljanović M</u>, Milković L, Čipak Gašparović A, Novak Kujundžić R, Mojzeš A, Gall Trošelj K. Various EZH2 transcript variants are present in cancer cell lines. Chromatin and Epigenetics. U: Akhtar A, Almouzni G, Churchman SL, Pombo A, Ponting C, urednici. Chromatin and Epigenetics; 2019, 1-4. svibnja; Heidelberg, Njemačka.