

VILNIAUS UNIVERSITETAS

GIEDRĖ VALIULIENĖ

EPIGENETINIS REGULIAVIMAS IR LEUKEMIJA –
NAUJŲ BIOLOGINIŲ, MOLEKULINIŲ IR TERAPINIŲ
ASPEKTŲ TYRIMAI

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2018 metai

Disertacija rengta 2011–2017 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute (iki 2016 m. Vilniaus universiteto Biochemijos institutas).

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	6
1. ĮVADAS	9
Darbo tikslas.....	11
Darbo uždaviniai	11
Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė	11
Ginamieji disertacijos teiginiai.....	12
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1. Kraujo ląstelių vystymasis (hematopoezė).....	13
2.2. Leukemija.....	14
2.2.1. Ūminė mieloidinė leukemija (ŪML).....	15
2.2.1.1. Ūminė promielocitinė leukemija (ŪPL).....	19
2.3. Epigenetiniai vėžio išsivystymo aspektai ir epigenetinė terapija.....	23
2.3.1. Chromatino modifikacijos.....	24
2.3.1.1. Histonų acetiltransferazės (HAT).....	26
2.3.1.2. Histonų deacetilazės (HDAC)	28
2.3.1.3. Histonų metiltransferazės (HMT).....	33
2.3.2. ŪML epigenetinė terapija.....	38
3. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI.....	42
3.1. Medžiagos ir reagentai	42
3.2. Prietaisai	45
3.3. Tyrimo objektas.....	46
3.3.1. HL-60 ląstelės.....	46
3.3.2. NB4 ląstelės.....	46
3.3.3. Imunodeficitinės NOG pelės.....	47
3.4. Metodai.....	47
3.4.1. Ląstelių kultivavimas	47
3.4.2. Ląstelių augimo ir gyvybingumo įvertinimas	48
3.4.3. Ląstelių diferenciacijos įvertinimas	48
3.4.4. Ląstelių ciklo analizė.....	49
3.4.5. Apoptozės nustatymas tėkmės citometrijos metodu	49
3.4.6. RNR išskyrimas ir kDNR sintezė.....	50
3.4.7. Genų raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu	50
3.4.8. Tirpaus chromatino išskyrimas sonikuojant.....	52
3.4.9. DNR išsodinimas ir DNR fragmentų analizė.....	52
3.4.10. Tirpaus chromatino imunoišsodinimas ir paruošimas kPGR.....	53
3.4.11. Tirpaus chromatino imunoišsodinimas MS tyrimui.....	55
3.4.12. MS tyrimas ir duomenų analizė	55
3.4.13. Bendro baltymo išskyrimas.....	55
3.4.14. Baltymų frakcionavimas elektroforeze	56
3.4.15. Baltymų imuninė analizė.....	56
3.4.16. HDAC ir HMT aktyvumo nustatymas	57
3.4.17. <i>In vivo</i> tyrimai	58

3.4.17.1. Ksenograftinių ŪPL pelių gavimas ir vėžinių ląstelių infiltracijos įvertinimas.....	58
3.4.17.2. ŪPL ksenograftinių pelių gydymas.....	58
3.4.17.3. Genų raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu.....	59
3.4.17.4. Baltymų raiškos įvertinimas.....	59
3.4.18. Statistinė analizė.....	59
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	60
4.1. BIX-01294 įtaka žmogaus ŪPL ląstelėms.....	60
4.1.1. BIX-01294 įtaka ląstelių augimui ir išgyvenamumui.....	60
4.1.2. BIX-01294 įtaka RA indukuotai ląstelių diferenciacijai.....	62
4.1.3. BIX-01249 įtaka ląstelių genų ir baltymų raiškai.....	64
4.1.4. Rezultatų aptarimas.....	66
4.2. Belinostato įtaka žmogaus ŪPL ląstelėms.....	70
4.2.1. Belinostato įtaka ląstelių augimui ir išgyvenamumui.....	70
4.2.2. Belinostato įtaka RA indukuotai ŪPL ląstelių diferenciacijai.....	74
4.2.3. Belinostato įtaka NB4 ląstelių genų ir baltymų raiškai.....	76
4.2.4. Belinostato įtaka NB4 ląstelių baltymų kompleksų, besirišančių su hiperacetilintu histonu H4, sudėčiai.....	79
4.2.5. Rezultatų aptarimas.....	86
4.3. HDACi Belinostato ir HMTi DZNep įtaka žmogaus ŪPL ląstelėms.....	91
4.3.1. Belinostato ir DZNep įtaka ląstelių augimui ir išgyvenamumui.....	91
4.3.2. Belinostato ir DZNep įtaka RA indukuotai ląstelių diferenciacijai.....	94
4.3.3. Belinostato ir DZNep įtaka ŪPL ląstelių genų ir baltymų raiškai bei histonų H3 ir H4 modifikacijoms.....	97
4.3.4. Belinostato ir DZNep kombinacijos su RA įtaka bendram HDAC ir EZH2 fermentiniam aktyvumui.....	101
4.3.5. Belinostato ir DZNep kombinacijos su RA įtaka acetilinto histono H4 sąveikai su <i>CEBPA</i> , <i>CEBPE</i> ir <i>PPARG</i> promotorinėmis sritimis.....	101
4.3.6. Rezultatų aptarimas.....	102
4.4. Epigenetinės terapijos įtaka histonų modifikacijų pokyčiams ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir epigenetinių modifikacijų charakterizavimas ksenograftų augliuose.....	106
4.4.1. ŪPL ksenograftinio modelio charakterizavimas.....	106
4.4.2. WT1 baltymo raiška ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir susiformavusiuose augliuose.....	109
4.4.3. Histonų modifikacijų pobūdis ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir susiformavusiuose augliuose.....	111
4.4.4. Rezultatų aptarimas.....	116
5. IŠVADOS.....	121
6. REZULTATŲ VIEŠINIMAS.....	122
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	127
PADĖKA.....	140
<i>Curriculum Vitae</i>	141

**Šioje disertacijoje pateikta medžiaga yra publikuota žemiau
nurodytuose šaltiniuose:**

1. Valiulienė G, Stirblytė I, Jasnauskaitė M, Borutinskaitė V, Navakauskienė R. Anti-leukemic effects of HDACi Belinostat and HMTi 3-Deazaneplanocin A on human acute promyelocytic leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2017; 799:143–53.
2. Valiulienė G, Treigyte G, Savickienė J, Matuzevičius D, Alksnė M, Jarašienė-Burinskaja R, Bukelskienė V, Navakauskas D, Navakauskienė R. Histone modifications patterns in tissues and tumours from acute promyelocytic leukemia xenograft model in response to combined epigenetic therapy. *Biomed Pharmacother.* 2016; 79:62–70.
3. Valiulienė G, Stirblyte I, Cicenaitė D, Kaupinis A, Valius M, Navakauskiene R. Belinostat, a potent HDACi, exerts antileukaemic effect in human acute promyelocytic leukaemia cells via chromatin remodelling. *J Cell Mol Med.* 2015; 19:1742–55.
4. Savickiene J, Treigyte G, Stirblyte I, Valiulienė G, Navakauskiene R. Euchromatic histone methyltransferase 2 inhibitor, BIX-01294, sensitizes human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells to growth inhibition and differentiation. *Leuk Res.* 2014; 38:822–9.
5. Savickiene J, Treigyte G, Valiulienė G, Stirblyte I, Navakauskiene R. Epigenetic and molecular mechanisms underlying the antileukemic activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat in human acute promyelocytic leukemia cells. *Anticancer Drugs.* 2014; 25:938–49.

SANTRUMPOS

ATG5 – genas, koduojantis autofagijos baltymą 5; angl.: *autophagy related 5*.

AT-kPGR – atvirkštinės transkriptazės kiekybinis polimerazės grandininės reakcijos metodas; angl.: *RT-qPCR*.

ATO – arseno trioksidas; angl.: *arsenic trioxide*.

BECN1 – genas, koduojantis baltymą Bekliną 1; angl.: *Beclin1*.

Bel – belinostatas ((2*E*)-*N*-Hidroksi-3-[3-(fenilsulfamoil)fenil]prop-2-enamidas; *PubChem CID*: 6918638); angl.: *belinostat*.

BET – bromo domeną ir papildomą galinį domeną turintis baltymas; angl.: *bromodomain and extraterminal domain*.

BIX – BIX-01294 (N-(1-benzilpiperidin-4-il)-6,7-dimetoksi-2-(4-metil-1,4-diazepan-1-il)kinazolin-4-aminas; *PubChem CID*: 25150857).

CBP – histonų acetiltransferazė; angl.: *CREB (cAMP response element-binding protein) binding protein*.

CD – paviršiniai žymenys; angl.: *cluster of differentiation*.

CDKN1B – nuo ciklinų priklausomų kinazių slopiklis 1B (P27, Kip1); angl.: *cyclin dependent kinase inhibitor 1B*.

CEBP – prie CCAAT/enhancerių prisijungiantys baltymai; angl.: *CCAAT/enhancer binding protein*.

ChIP – tirpaus chromatino imunoišsodinimas; angl.: *chromatin immunoprecipitation*.

DBR – poveikis 3-deazaneplanocinu A, belinostatu ir retinoine rūgštimi.

DMSO – dimetilsulfoksidas; angl.: *dimethyl sulfoxide*.

DNMT – DNR metiltransferazė; angl.: *DNA methyltransferase*.

DZNep – 3-deazaneplanocinas A (5R-(4-amino-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)-3-(hidroksimetil)-3-cyklopenten-1S,2R-diolis; *PubChem CID*: 73087); angl.: *3-deazaneplanocin A*.

ECL – imunobloto detektavimo reagentai; angl.: *enhanced chemiluminescence*.

EED – antrojo polikombinio represinio komplekso subvienetas;
angl.: *embryonic ectoderm development*.

EHMT2 – euchromatino histonų lizino N-metiltransferazė 2;
angl.: *euchromatic histone lysine methyltransferase 2*.

EZH2 – antrojo polikombinio represinio komplekso subvienetas;
angl.: *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*.

H2A, H2B, H3, H4, H1 – histonai.

HAT – histonų acetiltransferazė, acetilazė; katalitinis acetilazių domenas;
angl.: *histone acetyltransferase*.

HDAC – histonų deacetilazė; angl.: *histone deacetylase*.

HDACi – histonų deacetilazių slopiklis; angl.: *histone deacetylase inhibitor*.

HMT – histonų metiltransferazė; angl.: *histone methyltransferase*.

HMTi – histonų metiltransferazių slopiklis; angl.: *histone methyltransferase inhibitor*.

MS – masių spektrometrija; angl.: *mass spectrometry*.

MVA – maisto ir vaistų administracija; angl.: *Food and Drug Administration (FDA)*.

NBT – nitro tetrazolio mėlis; angl.: *nitro blue tetrazolium*.

NET – ekstraląsteliniai neutrofilų spąstai; angl.: *neutrophil extracellular traps*.

NOG – imunodeficitinės pelės.

NPM1 – nukleofosminas; angl.: *nucleophosmin*.

PAB – Prancūzų–Amerikiečių–Britų ūminės mieloidinės leukemijos klasifikacijos sistema; angl.: *French-American-British (FAB)*.

PARP – poli ADP ribozės polimerazė; angl.: *poly (ADP-ribose) polymerase*.

PCAF – histonų acetiltransferazė; angl.: *p300/CREB binding protein associated factor*.

PJ – propidžio jodidas; angl.: *propidium iodide*.

PML – promielocitinės leukemijos baltymas; angl.: *promyelocytic leukemia protein*.

PPAR – peroksisomų proliferatorių aktyvuojami receptoriai; angl.: *peroxisome proliferator-activated receptors*.

PRC2 – antrasis polikombinis represinis kompleksas; angl.: *polycomb repressive complex 2*.

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija; angl.: *World Health Organisation (WHO)*.

RA – retinoinė rūgštis; angl.: *retinoic acid*.

RAR – retinoinės rūgšties receptoriai; angl.: *retinoic acid receptor*.

RARE – retinoinės rūgšties atsako elementai; angl.: *RA response elements*.

RXR – retinoidiniai receptoriai; angl.: *retinoid X receptor*.

SUZ12 – antrojo polikombinio represinio komplekso subvienetas; angl.: *suppressor of zeste 12 protein*.

ŪML – ūminė mieloidinė leukemija; angl.: *acute myeloid leukemia (AML)*.

ŪPL – ūminė promielocitinė leukemija; angl.: *acute promyelocytic leukemia (APL)*.

WT1 – Vilmsio auglio baltymas; angl.: *Wilms tumour protein*.

1. ĮVADAS

Leukemija – hematopoetinių ląstelių liga, kurios metu pažeidžiamas balansas tarp ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir apoptozės. Paprastai, terminas leukemija (graikiškai *leukos* – baltas, *haima* – kraujas) nurodo vėžio atvejus, kuomet sutrikdoma baltųjų kraujo ląstelių (leukocitų) gamyba ir / ar funkcijos. Išskiriami du pagrindiniai leukemijos tipai: mieloidinė bei limfoidinė leukemija. Kiekviena iš jų, savo ruožtu, gali būti tiek ūminės, tiek lėtinės formos. Terminas limfoidinė nurodo, jog vėžiniai pakitimai vyksta kaulų čiulpų ląstelėse, iš kurių vėliau formuosis limfocitai. Mieloidinė – ląstelėse, kurios duos pradžią granulocitams ar monocitams (pagal *National Cancer Institute*, atn. 2014).

Kasmet keletui tūkstančių žmonių visame pasaulyje diagnozuojama ūminė promielocitinė leukemija (ŪPL; ūminės mieloidinės leukemijos potipis). Anksčiau viena piktybiškiausių laikytų vėžio formų, ŪPL dabar yra viena iš lengviausiai suvaldomų (Lo Coco ir Cicconi, 2011). Įprastai ŪPL pacientai gydomi antraciklinų ir RA (angl: *all trans retinoic acid*) deriniu (Lo Coco ir kt., 2013). Parodyta, jog RA geba indukuoti promielocitinės leukemijos ląstelių diferenciaciją į subrendusius granulocitus (apžv. Özpolat, 2009). Tad šiuo metu ŪPL pasitarnauja kaip puikus modelis, siekiant iširti bei įvertinti diferenciacinės terapijos efektyvumą. Visgi, nepaisant RA terapijos pasisekimo, didele problema išlieka gydymui RA atsparūs atvejai (Fung ir So, 2013; Tomita ir kt., 2013). Pasak Gallagher (2002), antrinis, įgytas, atsparumas gydymui RA pasitaiko daugumai pacientų, gydytų viena RA arba RA kartu su chemoterapiniais medikamentais. Parodyta, jog ŪPL atsparumą RA gali pašalinti epigenetiškai aktyvūs junginiai (apžv. Arteaga ir kt., 2015). Be to, yra žinoma, kad kitų ŪML atveju nepakankamas atsakas į gydymą su RA taip pat priklauso ir nuo epigenetinių veiksnių (apžv. Schenk ir kt., 2014). Tai, savo ruožtu, leidžia daryti prielaidą, jog diferenciacinę leukemijos terapiją būtų racionalu taikyti kartu su epigenetiškai aktyviais junginiais.

Pirmieji pavyzdžiai, jog epigenetiniai pakitimai yra grįžtami ir kad tam tikri cheminiai junginiai geba modifikuoti epigenetinį vaizdą, pasirodė praėjusio šimtmečio aštunto dešimtmečio pabaigoje (apžv. Ahuja ir kt., 2016). Visgi praėjo dar keliolika metų, kol epigenetinė vėžio terapija, kaip alternatyva įprastiniams gydymo metodams ar kaip jų papildymas, sulaukė didesnio susidomėjimo. Tuo metu identifikuoti ir pirmieji chromatiną modifikuojantys fermentai: histonų acetiltransferazės CBP (Bannister ir Kouzarides, 1996) ir PCAF (Ogryzko ir kt., 1996). Supratimą, jog vėžio patogenezėje epigenetiniai pakitimai vaidina itin svarbų vaidmenį sustiprino ir mokslininkų tyrimai, parodę, kad įvairių vėžinių susirgimų atveju itin dažnai aptinkamos mutacijos genuose, koduojančiuose baltymus, kurie modifikuoja histonus, pašalina histonų modifikacijas ar atpažįsta jas. Aptinkamos mutacijos ir chromatiną pertvarkančių baltymų bei pačių histonų genuose (apžv. Dawson ir Kouzarides, 2012; Lawrence ir kt., 2014).

Turbūt nesuklysimė teigdami, kad epigenetinė vėžio terapija sulaukia vis daugiau susidomėjimo ir pamažu skinasi kelią įprastoje vėžinių susirgimų gydymo praktikoje. Keletas epigenetinių slopiklių jau yra oficialiai patvirtinti ir rutiniškai naudojami gydant vėžinius susirgimus (apžv. Heerboth ir kt., 2014). Apie tai bus kalbama plačiau tolimesniuose skyriuose. Reikėtų paminėti, jog epigenetinė vėžio terapija pasitarnauja keletu lygmenų. Veikdami epigenetinių modifikatorių slopikliais galime keisti vėžio ląstelių epigenetinį būvį (apžv. Wee ir kt., 2014). Naudodami BET (angl.: *bromodomain and extraterminal domain*) slopiklius, tuo pačiu nuslopiname ir myc raišką – vieno stipriausiai proliferaciją skatinančių onkogenų, kurio anksčiau kitokiais vaistais paveikti nepavykdavo (McKeown ir Bradner, 2014; Aird ir kt., 2017). Parodytas ir epigenetikos bei imuninės sistemos ryšys. Daug žadantis vėžio terapijos būdas – paties organizmo imuninės sistemos sužadimas kovai prieš vėžį (apžv. Khalil ir kt., 2016). Žinoma, jog epigenetiniai mechanizmai yra itin svarbūs imuninės sistemos vystymuisi ir jos kontrolei. Pavyzdžiui, parodyta, kad EZH2 (polikombinio represinio baltymų komplekso PRC2 subvienetas) reguliuoja T ląstelių diferenciaciją ir jų aktyvumą (DuPage ir kt., 2015; Yang ir

kt., 2015). Be to, žinoma, kad EZH2 ir DNMT (DNR metiltransferazių) nuslopinimas geba pritraukti T ląsteles prie navikų ir skatina T ląstelių infiltraciją (Peng ir kt., 2015). Paminėtina ir tai, kad HDACi (histonų deacetilazių slopikliai) gali pasitarnauti ir chemoterapijos bei jonizuojančios terapijos efektyvumui sustiprinti (Diyabalanage ir kt., 2013; Blattmann ir kt., 2015). Reikėtų pažymėti, jog epigenetinė terapija plačiau taikoma hematologinių susirgimų gydymui – dėl tam tikrų priežasčių standieji navikai yra atsparesni šiai terapijai (apžv. Hatzimichael ir Crook, 2013).

Darbo tikslas – įvertinti epigenetinio reguliavimo įtaką žmogaus ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių granulocitinei diferenciacijai.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti HMTi BIX-01294, 3-deazaneplanocino A, HDACi belinostato ir retinoinės rūgšties poveikį NB4 ir HL-60 (ŪPL) ląstelių augimui, gyvybingumui ir granulocitinei diferenciacijai.
2. Įvertinti genų ir jų koduojamų baltymų, susijusių su chromatino pertvarkymu, ląstelės ciklu ir diferenciacija, raiškos pokyčius ŪPL ląstelėse, paveiktose BIX-01294, 3-deazaneplanocinu A, belinostatu ir retinoine rūgštimi bei šių junginių kombinacijomis.
3. Nustatyti naudotų junginių įtaką ŪPL ląstelių histonų epigenetinėms modifikacijoms.
4. Nustatyti baltymus, esančius baltymų kompleksuose kartu su hiperacetilintu histonu H4.
5. Sukurti ŪPL ksenograftinių NOG pelių modelį ir *in vivo* įvertinti naudotos epigenetinės terapijos efektyvumą.

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė:

Atliktais tyrimais pirmą kartą parodėme, kad HDACi belinostatas (PXD101), HMTi BIX-01294 bei 3-deazaneplanocinas A sustiprina RA indukuotą žmogaus ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių NB4 ir HL-60

diferenciaciją į granulocitus. Gauti rezultatai *in vitro* lygmenyje patvirtina ŪPL epigenetinės terapijos efektyvumą.

Taip pat pirmą kartą parodėme, jog kontrolinėse NB4 ląstelėse hiperacetilintas histonas H4 yra randamas kartu su DNR replikacija ir transkripcija susijusiais baltymais (pvz., POLA2, GCOM1, POLR2M, NELFE), o po poveikio belinostatu – su baltymais, svarbiais proapoptoziniams procesams (pvz., S100A9, S100A8, LGALS7, GOLGA3), apsaugai nuo oksidacinio streso (TXNRD2) ir vėžio slopikliais (APC). Šie rezultatai praplečia turimas žinias apie belinostato veikimo mechanizmus vėžio ląstelėse.

Darbo metu sukūrėme ŪPL ksenograftinių NOG pelių modelį, jį charakterizavome ir parodėme, kad šis modelis gali būti sėkmingai naudojamas siekiant įvertinti ŪPL epigenetinės terapijos efektyvumą. Mūsų tyrimai tai pat pademonstravo, kad gydymas belinostato, 3-deazaneplanocino A ir RA kombinacija prailgina ŪPL ksenograftinių pelių išgyvenimo trukmę ir apsaugo jas nuo auglių susiformavimo. Be to, pirmą kartą įvertinome epigenetinės terapijos įtaką histonų modifikacijų pokyčiams ŪPL ksenograftinių pelių augliuose ir audiniuose. Gauti duomenys gali pasitarnauti tolimesniems ŪPL epigenetinės terapijos klinikiniams tyrimams.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

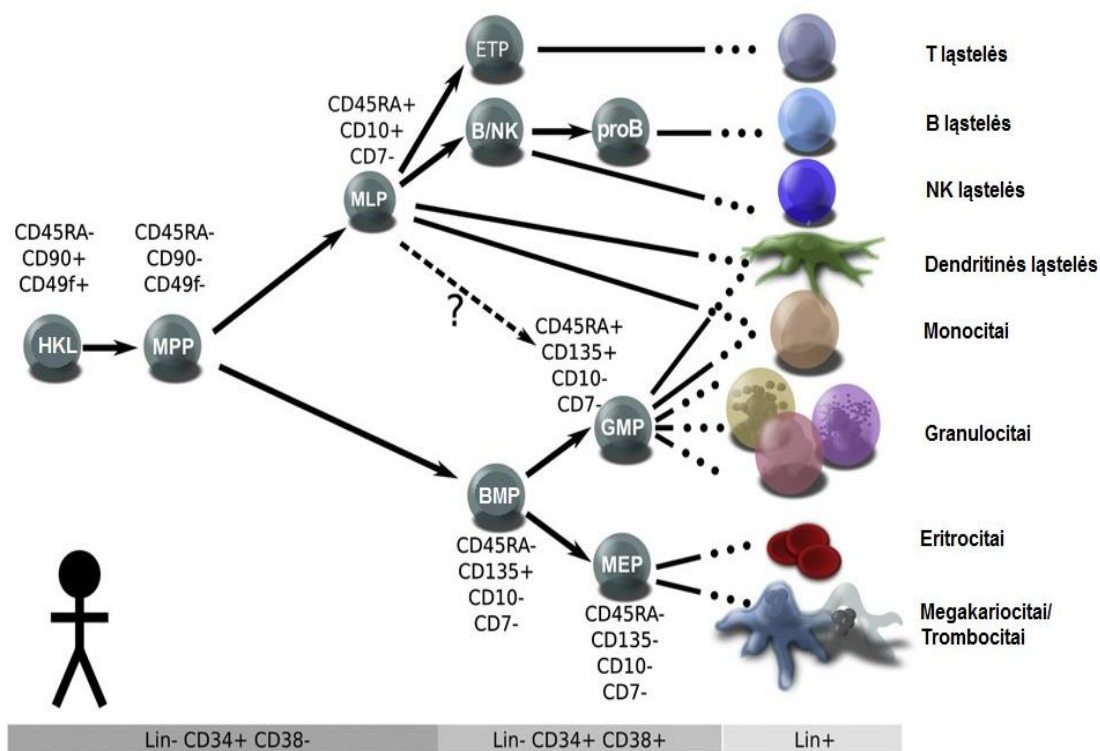
1. HDAC ir HMT slopikliai ŪPL ląstelėse sustiprina retinoinės rūgšties diferenciacinį poveikį.
2. Kombinuoti poveikiai, naudojant HDACi bei HMTi, pasižymi didesniu diferenciaciją sustiprinančiu efektyvumu nei poveikiai pavieniais junginiais.
3. Kombinuoti poveikiai (HDACi, HMTi ir RA) pakeičia epigenetinį ŪPL ląstelių būvį ir padidina su diferenciacija susijusių genų (*CEBPE*, *PPARG*) bei nuslopiną epigenetinių modifikatorių (HDAC1, HDAC2 ir PRC2 komplekso) baltymų raišką.
4. Epigenetinė terapija *in vivo* prailgina ksenograftinių pelių išgyvenimo trukmę, apsaugo nuo auglių susiformavimo bei pakeičia audinių ląstelių epigenetinį būvį.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Kraujo ląstelių vystymasis (hematopoezė)

Hematopoetinių ląstelių hierarchinėje sistemoje ankstyviausia ląstele laikoma daugiagalė (multipotentinė) hematopoetinė kamieninė ląstelė (HKL; dar kitaip vadinama hemocitoblastu). Embrione iš mezodermos susiformuoja hemangioblastas, iš pastarojo – homogeninis endotelis, šis duoda pradžią HKL pirmtakams, iš kurių ir išsivysto HKL (Lancrin ir kt., 2010). Tik susiformavusios HKL aptinkamos keletose skirtingų anatominių nišų (pvz., placentos kraujagyslėse ar embriono kepenyse), kuriose dauginasi. Galiausiai šios ląstelės apsistoja kaulų čiulpuose, kur ir lieka visą suaugusio individo gyvenimą (visgi žinoma, jog HKL tam tikrais atvejais migruoja ir į periferinį kraują) (apžv. Boisset ir Robin, 2012). HKL išlaiko gebėjimą dalytis ir taip atnaujinti savo populiaciją, taip pat geba proliferuoti ir diferencijuoti į bet kurias subrendusias kraujo ląsteles. Nustatyta keletas HKL fiziologijai itin svarbių transkripcijos veiksnių: tokių kaip GATA-2 bei Lmo-2, kurie yra būtini pirminei ir galutinei hematopoezei, taip pat ir AML-1, be kurio negalėtų įvykti paskutiniai hematopoezės etapai (Wilkinson ir Göttgens, 2013).

Klasikinis hematopoezės modelis nurodo, jog limfoidinis ir mielo-eritroidinis keliai išsiskiria jau ankstyvoje hematopoezės stadijoje. Naujesnis hematopoezės modelis teigia, jog ląstelės, kurios taps limfocitais, dar ilgai išlaiko potencialą diferencijuoti ir mieloidine kryptimi (Doulatov ir kt., 2010; Kawamoto ir kt., 2010). Manoma, jog kai kurios mieloidinio kelio ląstelės (makrofagai ir dendritinės ląstelės) gali būti kilusios tiek iš mieloidinės, tiek iš limfoidinės atšakos (Görgens ir kt., 2013). Žemiau pateikta apibendrinta žmogaus kraujodaros schema (2.1.1 pav.).



2.1.1 pav. Apibendrinta žmogaus kraujodaros schema. HKL – hematopoetinės kamieninės ląstelės; MPP – multipotentiniai pirmtakai; MLP – nesubrendę limfoidiniai pirmtakai; BMP – bendri mieloidiniai pirmtakai; GMP – granulocitų ir monocitų pirmtakas; MEP – megakariocitų ir eritrocitų pirmtakas; Lin – ląstelės paviršinių žymenų visuma, būdinga visiškai diferencijuotoms ląstelėms (B, T, NK ir dendritinėms ląstelėms, monocitams, granulocitams, megakariocitams ir eritrocitams). Prie atitinkamų ląstelių pirmtakų taip pat nurodyti ir išskirtinai jiems būdingi paviršiniai žymenys (pagal Doulatov ir kt., 2012).

1997 metais identifikuotos ūminės mieloblastinės leukemijos kamieninės ląstelės (LKL) (Bonnet ir kt., 1997). Vėliau LKL aptiktos ir kitų leukemijų atveju. Dabar pripažįstama, kad LKL atsiranda iš normalių hematopoetinių kamieninių ląstelių ar kitų ląstelių pirmtakių, esančių skirtingose diferenciacijos stadijose. Parodyta, kad šios ląstelės supiktybėja dėl gausių genetinių ir epigenetinių pakitimų (Wang ir kt., 2017).

2.2. Leukemija

Kaip jau minėta, leukemija – tai kraujo ląstelių liga, kurios metu sutrikdomas balansas tarp ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir apoptozės. **Leukemijos simptomai** būna įvairūs ir priklauso nuo leukemijos tipo. Gali pasireikšti karščiavimas ar šaltkrėtis, ilgalaikis nuovargis, silpnumas, dažni ir sunkiai gyjantys infekciniai susirgimai, svorio netekimas, padidėję limfiniai

mazgai, kepenys ir blužnis, dažnas mėlynių atsiradimas ar ilgas kraujavimas susižeidus, dažnas kraujavimas iš nosies, petichijos (maži raudoni taškeliai ant odos), padidėjęs prakaitavimas (ypač nakties metu), kaulų skausmas ar trapumas (Guenova ir Balatzenko, 2013).

Kaip ir daugumos vėžinių susirgimų, galima leukemijos **išsivystymo priežastis** – susikaupusios retos genetinės mutacijos, kurios, šiuo atveju, pažeidžia įprastą kraujodaros sistemos ląstelių pirmtakių vystymąsi. Leukemija susirgti labiau rizikuoja asmenys, kuriems prieš tai taikyta chemoterapija ar gydymui naudota radiacinė terapija. Apskritai, skirtingų leukemijų ir priežastys gali būti skirtingos. Manoma, jog kai kurio tipo leukemijas gali sukelti ir virusai, konkrečiai – ŽTLV-1 (žmogaus T-limfotropinis virusas) ir ŽIV (žmogaus imunodeficito virusas). Leukemijos išsivystymui įtakos gali turėti ir aplinkos tarša benzenu ar kitais naftos produktais. Taip pat leukemija gali būti perduodama ir iš mamos vaisiui, nors tai ir labai reti atvejai. Galima ir genetinė predispozicija, kuomet, dėl vieno ar kelių pakitusių genų, šeimos istorijoje pasitaiko ne vienas leukemijos atvejis. Be to, yra žinoma, jog žmonės, turintys chromosominių pakitimų (pvz., sergantys Dauno sindromu), labiau rizikuoja susirgti ir leukemija (*Medical News Today*, 2016).

Yra daug genetinių mutacijų, kurios bendrai siejamos su leukemijos išsivystymu. Savo ruožtu, kai kurios genetinės mutacijos sietinos su konkretaus tipo leukemija. Ūminė žmogaus promielocitinė leukemija (ŪPL) – vienas iš tokių pavyzdžių. ŪPL išsivystymas genetiškai susijęs su chromosominėmis translokacijomis tarp retinoinės rūgšties (RA) receptoriaus alfa (*RARA*) lokuso 17 chromosomoje ir vieno iš aštuonių skirtingų genų partnerių: *PML*, *ZBTB16*, *NPM1*, *STAT5B*, *BCOR*, *PRKARIA*, *FIP1L1* ir *NABP1* (apžv. De Braekeleer ir kt. 2014).

2.2.1. Ūminė mieloidinė leukemija (ŪML)

ŪML – grupė skirtingų leukemijos tipų, pažeidžiančių mieloidines kraujo sistemos ląsteles. Raudonuosiuose kaulų čiulpuose itin sparčiai ir gausiai pradeda daugintis nesubrendusios baltosios kraujo ląstelės, dar vadinamos

mieloblastais ar leukeminiais blastais. Ūminė mieloidinė leukemija **nustatoma** atlikus morfologinį kraujo čiulpų mėginių ir periferinio kraujo tepinėlių tyrimą, įvertinus ląstelės paviršinius ir citoplazminius žymenis tėkmės citometrija, atlikus citogenetinius tyrimus, pastaruoju metu pasitelkiami ir molekuliniai genetinių pažeidimų tyrimų metodai (pagal *American Cancer Society (ACS)*, 2016).

Ūminė mieloidinė leukemija **klasifikuojama** naudojant dvi sistemas: PAB (Prancūzų–Amerikiečių–Britų) ir PSO (Pasaulio sveikatos organizacijos). PAB klasifikacijos sistema (Lowenberg ir kt., 1999) pasiūlyta jau prieš keletą dešimtmečių. Pagal ją, ŪML, priklausomai nuo to, iš kurių ląstelių vystosi vėžys ir koks vėžinių ląstelių subrendimo lygis, skirstoma į potipius nuo M0 iki M7. Metodika didžiąja dalimi remiasi ląstelių mikroskopavimu nudažius. Nors ir ganėtinai sena, PAB klasifikacija vis dar aktuali ir dažnai naudojama ŪML grupavimui. Visgi ši sistema neatsižvelgia į daugelį veiksnių, kurie svarbūs prognozuojant ligos eigą. PSO sukūrė naujesnę klasifikacijos sistemą, kurioje įtraukti ir kai kurie minėti veiksniai, taip bandoma geriau suklasifikuoti ŪML. Pagal PSO hematopoetinių ir limfoidinių audinių vėžio klasifikaciją (paskutinį kartą atnaujinta 2016; Arber ir kt., 2016) išskiriamos šios ŪML kategorijos: ŪML su būdingais genetiniais pakitimais, ŪML turinti su mielodisplazija susijusių pakitimų, ŪML susijusi su gydymu (antrinė ŪML), kitaip neapibūdinama ŪML (šiai grupei priskiriami ŪML tipai, nepriklausantys anksčiau paminėtoms kategorijoms; pažymėtina, jog kategorijos viduje klasifikacija panaši į PAB), mieloidinė sarkoma ir mieloidinė proliferacija siejama su Dauno sindromu. Visgi ir PSO klasifikacija yra peržiūrima bei keičiama, ypač ŪML, turinčių būdingų genetinių pakitimų, kategorijoje. Žemiau pateikta tiek PAB (2.2.1.1 lentelė), tiek ir PSO (2.2.1.2 lentelė) smulkesnė ŪML klasifikacija.

Tipiškai ŪML **gydoma** pasitelkiant chemoterapiją, imunoterapiją, spindulinę ir hormoninę terapiją ar kaulų čiulpų transplantaciją (pagal ACS, 2016). Apie ŪPL gydymą plačiau bus kalbama tolimesniuose skyriuose.

2.2.1.1 lentelė. PAB ŪML ir susijusių genolinių susirgimų klasifikacija (pagal Lowenberg ir kt., 1999).

PAB tipas	Pavadinimas (atvejai, %)	Dažymo rezultatai			Susijusios translokacijos ir persitvarkymai (atvejai, %)	Atsakingi genai
		MP	SJ	NE		
M0	Ūminė mieloblastinė leukemija, pasižyminti žemu diferenciacijos laipsniu (3 %)	–	–	–*	inv(3q26) ir t(3;3) (1 %)	<i>EVII</i>
M1	Ūminė mieloblastinė leukemija, kuriai būdingas ląstelių nesubrendimas (15–20 %)	+	+	–		
M2	Ūminė mieloblastinė leukemija, kuriai būdinga ląstelių branda (25–30 %)	+	+	–	t(8;21) (40%), t(6;9) (1 %)	<i>AML1-ETO, DEC-CAN</i>
M3	Ūminė promielocitinė leukemija (5–10 %)	+	+	–	t(15;17) (98 %), t(11;17) (1 %), t(5;17) (1 %)	<i>PML-RARα, PLZF-RARα, NPM-RARα</i>
M4	Ūminė mielomonoblastinė leukemija (20 %)	+	+	+	11q23 (20 %), inv(3q26) ir t(3;3) (3 %), t(6;9) (1 %)	<i>MLL, DEK-CAN, EVII</i>
M4Eo	Ūminė mielomonoblastinė leukemija, kuriai būdingi pakitę eozinofilai (5–10 %)	+	+	+	inv(16), t(16;16) (80 %)	<i>CBFβ-MYHII</i>
M5	Ūminė monocitinė leukemija (2–9 %)	–	–	+	11q23 (20 %), t(8;16) (2 %)	<i>MLL, MOZ-CBP</i>
M6	Eritroblastinė leukemija (3–5 %)	+	+	–		
M7	Ūminė megakarioblastinė leukemija (3–12 %)	–	–	+†	t(1;22) (5 %)	Nežinoma

MP – mieloperoksidazė; **SJ** – Sudano juodasis; **NE** – nespecifinė esterazė.
 * Ląstelės pasižymi teigiama reakcija į mieloidinius antigenus (pvz., CD13 ir CD33).
 † Ląstelės yra jautrios α -naftilacetatui, trombocitų glikobaltymams IIb / IIIa ir su veiksniais VIII–susijusiems antigenams, tačiau nepasižymi atsaku į naftilbutiratą.

2.2.1.2 lentelė. PSO ŪML ir susijusių genetinių susirgimų klasifikacija (pagal Arber ir kt., 2016).

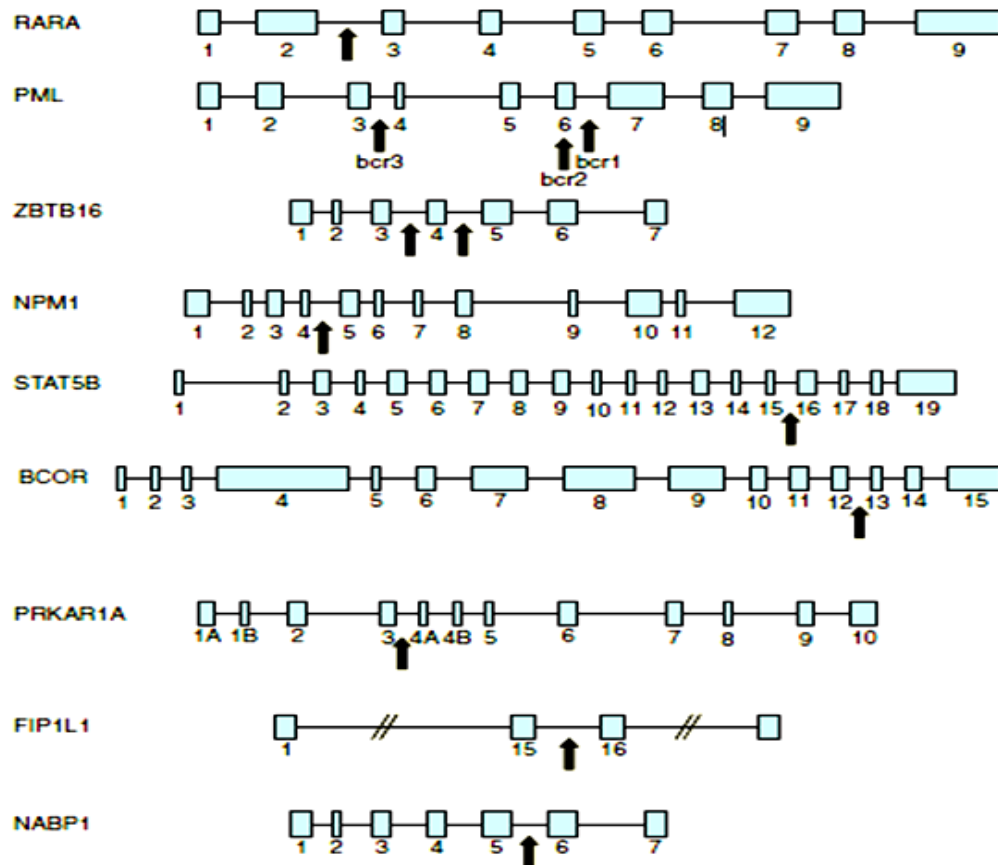
ŪML tipas	ŪML potipis
ŪML su būdingais genetiniais pakitimais	ŪML su t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNXTIT1</i> , ŪML su inv(16)(p13.1q22) arba t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> , ŪPL su <i>PML-RARA</i> , ŪML su t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> , ŪML su t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> , ŪML su inv(3)(q21.3q26.2) arba t(3;3)(q21.3;q26.2), <i>GATA2, MECOM</i> , ŪML (megakarioblastinė) su t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKLI</i> , <i>Peržiūrima: ŪML su BCR-ABL1</i> , ŪML su <i>NPM1</i> mutacija, ŪML su bialelinėmis <i>CEBPA</i> mutacijomis, <i>Peržiūrima: ŪML su RUNX1</i> mutacija
ŪML turinti su mielodisplazija susijusių pakitimų	
ŪML atsiradusi dėl prieš tai buvusios chemoterapijos ar spindulinės terapijos	
ŪML kitaip neapibūdinama (įtrauktos tos ŪML formos, nepriskiriamos anksčiau aptartoms grupėms; klasifikacija panaši į PAB)	ŪML, kuri minimaliai diferencijuota (M0), ŪML, kuriai trūksta subrendimo (M1), ŪML, kuriai būdingas subrendimas (M2), Ūminė mielomonocitinė leukemija (M4), Ūminė monoblastinė / monocitinė leukemija (M5), Gryna eritroidinė leukemija (M6), Ūminė megakarioblastinė leukemija (M7), Ūminė bazofilinė leukemija, Ūminė panmielozė su fibroze
Mieloidinė sarkoma (dar žinoma kaip granulocitinė sarkoma ar chloroma)	
Mieloidinė proliferacija siejama su Dauno sindromu	Laikina pakitusi mielopoezė (<i>TAM</i>), Mieloidinė leukemija susijusi su Dauno sindromu

2.2.1.1. Ūminė promielocitinė leukemija (ŪPL)

ŪPL (ŪML M3 tipas pagal PAB) fenotipiškai apibūdinama kloninių hematopoetinių ląstelių pradininkių, sustojusių promielocitinėje vystymosi stadijoje, susikaupimu. Kaip jau aptarta anksčiau, genetiškai tai susiję su chromosominėmis translokacijomis tarp retinoinės rūgšties receptoriaus alfa lokuso 17 chromosomoje ir vieno iš aštuonių skirtingų genų partnerių: *PML*, *ZBTB16*, *NPM1*, *STAT5B*, *BCOR*, *PRKARIA*, *FIP1L1* ir *NABP1* (apžv. De Braekeleer ir kt. 2014) (2.2.1.1.1 pav.). Įvykus šioms chromosominėms translokacijoms sutrinka ir RA signalinių kelių veikla. Reikia pažymėti, jog RA signalo perdavime dalyvauja du steroidinių / tiroidinių branduolio receptorių superšeimos tipai: RAR (retinoinės rūgšties receptoriai) ir RXR (reksinoidiniai receptoriai). Šie receptoriai atlieka ligando indukuojamą transkripcijos veiksmų funkciją. Tiek vieni, tiek kiti būna trijų skirtingų izoformų: α , β ir γ . RAR šeimą ($RAR\alpha$, $RAR\beta$ ir $RAR\gamma$) aktyvuoja RA ir 9-cis RA, o RXR šeimą ($RXR\alpha$, $RXR\beta$ ir $RXR\gamma$) aktyvuoja tik 9-cis RA. RAR ir RXR baltymai suformuoja heterodimerus, kurie vėliau jungiasi prie atitinkamų genų RARE (angl.: *RA response elements*) sekų ir taip aktyvuoja signalines kaskadas (Lo Coco ir kt., 1998).

RARA translokacijų partneriai priklauso skirtingoms genų šeimoms ir nepasižymi funkcinio panašumu. Visgi visi pastarieji chimeriniai baltymai gali dalyvauti baltymo–baltymo sąveikoje, geba jungtis prie reksinoidinių receptorių ir suformuoti didesnio molekulinio svorio hetero-oligomerinius kompleksus, kurie atitinkamai toliau jungiasi prie RARE sekų (Zeisig ir kt., 2007; Sukhai ir kt., 2008). Šie chimeriniai baltymai nustelbia laukinio tipo $RAR\alpha/RXR\alpha$ transkripcinį aktyvumą (Melnick ir Licht, 1999). Be to, $RAR\alpha$ chimeriniai baltymai gali homodimerizuotis ir taip paveikti daugiau genų, ne vien tik įprastinius $RAR\alpha$ genus taikinius (Kamashev ir kt., 2004; Sternsdorf ir kt., 2006). Paminėtina, jog prie leukemogenezės mechanizmų prisideda ir *RARA* suliejimo genų partnerių funkcijų blokavimas. Pavyzdžiui, *PML* atlieka

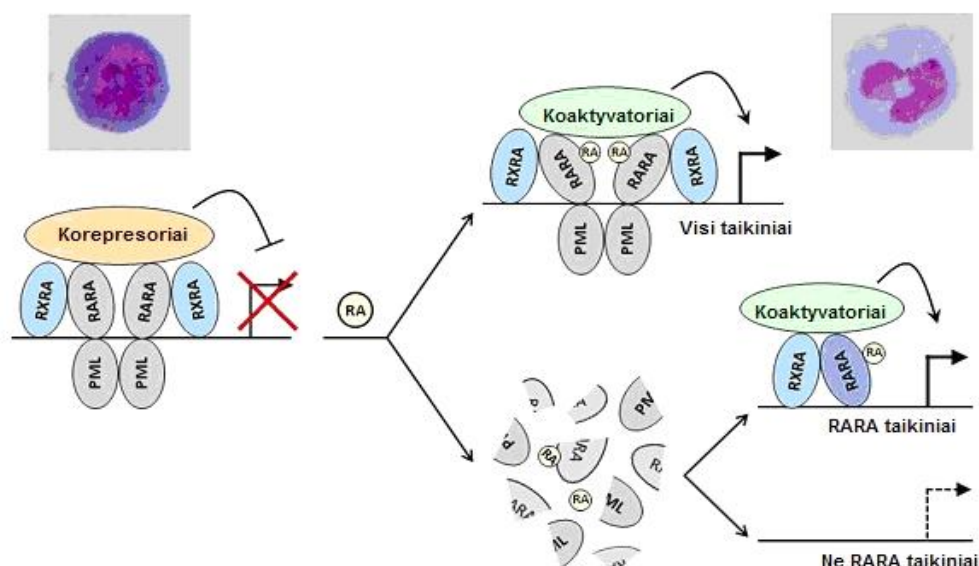
transkripcijos veiksnio ir galimai auglio slopiklio funkcijas. Taip pat yra žinoma, kad PML baltymas dalyvauja daugelyje apoptozinių kaskadų, o PML-RAR α funkciškai nuslopinus PML, promielocitinės leukemijos ląstelės tampa atsparios apoptozės procesams (apžv. Mazza ir Pelicci, 2013).



2.2.1.1.1 pav. Scheminis *RARA* geno ir jo suliejimo genų partnerių vaizdas. Kvadratai vaizduoja egzonus, o rodyklėmis pažymėti genų lūžio taškai. BCOR – BCL6 korepresorius; FIP1L1 – veiksnys, sąveikaujantis su PAPOLA ir CPSF1; NABP1 – nukleorūgštis prisijungiantis baltymas 1; NPM – nukleofozminas; PML – promielocitinės leukemijos baltymas; PRKAR – nuo cAMP priklausoma baltymų kinazė, reguliuojanti, Ia tipo; RARA – retinoinės rūgšties receptorius α ; ZBTB16 – cinko pirštų ir BTB domenų turintis 16-as baltymas (De Braekeleer ir kt., 2014).

PML-RAR α , t(15;17) (q24;q21), – geriausiai ištirtas ir dažniausiai ŪPL aptinkamas sulietas baltymas (iki 98 % visų ŪPL atvejų). PML/RAR α baltymas slopina genų raišką pritraukdamas prie genų taikinių N-Cor/sin3A/HDAC1 slopiklių kompleksą, kuris pašalina nukleosominių histonų H2A, H2B, H3 ir H4 acetilinimą. Svarbu paminėti, jog, palyginus su RAR α , PML-RAR α pasižymi didesniu afiniškumu transkripcijos slopikliams.

Pažymėtina, jog esant fiziologinei RA koncentracijai (10^{-9} – 10^{-8} M) PML-RAR α išlieka susirišęs su minėtais transkripcijos slopikliais, tad reikalingos didesnės, farmakologinės, RA koncentracijos (10^{-6} M), tam, kad NCoR-HDAC kompleksas disocijuotų ir būtų pritraukti histonus acetilinantys fermentai (Croce, 2005). Su RA susiję ŪPL ląstelių diferenciacijos mechanizmai pavaizduoti 2.2.1.1.2 pav. Yra žinoma, jog poveikis RA ne tik padeda vietoj slopiklių pritraukti histonų acetiltransferazes (HAT), tačiau aktyvuoja ir proteazes, kurios, savo ruožtu, sukarpo PML-RAR α baltymą (apžv. Ablain ir The, 2014).



2.2.1.1.2 pav. Galimi RA indukuotos ŪPL diferenciacijos mechanizmai. Manoma, jog ŪPL ląstelių diferenciacija po poveikio RA priklauso nuo paties PML-RAR α baltymo inicijuoto genų raiškos aktyvavimo – aktyvuojami prieš tai nuslopinti genai (viršus, dešinė). Visgi yra žinoma, kad po poveikio RA dalis PML-RAR α baltymo yra degraduojama. Šie duomenys davė prielaidą alternatyvaus diferenciaciją aiškinančio modelio sukūrimui. Pastarasis modelis teigia, jog, nesant PML-RAR α chimerinio baltymo, kiti transkripcijos veiksniai gali lengviau patekti prie savo genų taikinių promotorinių sekų ir taip inicijuoti šių genų raišką. Tarp minėtų transkripcijos veiksnių gali būti ir RA prisijungę RAR α kompleksai, gebantys atkurti įprastus mieloidinės diferenciacijos procesus (apačia, dešinė). Nuotraukos iliustruoja May-Grunwald-Giemsą nudažytas nepaveiktas, nesubrendusias (kairė) ir RA paveiktas, diferencijuotas (dešinė) ŪPL ląsteles (pagal Ablain ir The, 2014).

Būtina paminėti, jog su PML-RAR α susiję ŪPL ląstelių diferenciacijos bloko molekuliniai mechanizmai dar nėra visiškai ištirti. Priklausomai nuo PML-RAR α sulietinio baltymo izoformos skiriasi ir atsakas į gydymą su RA.

Pavyzdžiui, pacientai, turintys PML 7a egzono įterpimą (inserciją), yra atsparūs RA terapijai (Park ir kt., 2009). Neseniai nustatyta, jog trumpoji izoforma, kurioje nėra ilgojo PML-RAR α tipo 5 ir 6 egzonų, taip pat yra atspari gydymui su RA (Tan ir kt., 2013).

Kalbant apie **ŪPL gydymą**, reikia pažymėti, jog daugumos ŪPL atvejų gydymas skiriasi nuo įprastų ŪML gydymui taikomų metodų. Indukcijos metu gydymui naudojama RA kartu su antraciklinais (daunorubicinu ar idarubicinu, angl.: *daunorubicin*, *idarubicin*) arba kartu su kitu chemoterapiniu junginiu citarabinu (ara-c, angl.: *cytarabine*). Taip pat RA gali būti naudojama su dar vienu diferenciaciją skatinančiu junginiu arseno trioksidu (ATO). Pasiekus remisiją toliau taikoma konsolidacijos terapija. Jos pobūdis priklauso nuo to, kokie vaistai naudoti indukcijos stadijoje. Kai kuriems pacientams pabaigus konsolidacinį gydymą gali būti taikoma ir palaikomoji terapija, kuriai naudojama RA. Palaikomasis gydymas trunka mažiausiai metus. Kartais gydymui mažomis dozėmis taip pat naudojami ir chemoterapiniai junginiai 6-merkaptopurinas (6-MP, angl.: *6-mercaptopurine*) arba metotreksatas (angl.: *methotrexate*) (pagal ACS, 2016).

Tokia gydymo strategija leidžia sulaukti neblogų rezultatų – didžioji dalis pacientų pasiekia remisiją, t. y., taikant gydymą RA ir antraciklinais pagijusių pacientų skaičius gali siekti iki 80 % (Sanz ir Lo Coco, 2011), o taikant gydymą RA kartu su ATO galima pasiekti ir dar geresnių, stabilesnių rezultatų. Be kita ko, ši kombinacija yra ir mažiau citotoksiška nei RA kartu su antraciklinais (Lo Coco ir kt., 2013; Burnett ir kt., 2015). Visgi, nepaisant RA ir ATO terapijos pasisekimo, didele problema išlieka gydymui RA ir / arba ATO atsparūs atvejai (Fung ir So, 2013; Tomita ir kt., 2013). Pavyzdžiui, pasak Gallagher (2002), pirminis PML-RAR α teigiamų ŪPL ląstelių atsparumas gydymui RA pasitaiko retai, tačiau reikšmingai išauga po ≥ 2 atkryčių nuo chemoterapijos indukuotos visiškos remisijos. Taip pat nurodoma, jog antrinis, įgytas, atsparumas RA pasitaiko daugumai pacientų, gydytų viena RA arba RA kartu su chemoterapija. Taip pat yra žinoma, kad atsparumas RA atvirkščiai koreliuoja ir su laiko trukme nuo paskutinio RA

pateikimo: atsparumas išsivysto 18/18 (100 %) pacientų, kurie „atkrenta” paties RA gydymo metu, 19/25 (76 %) pacientų, kurie „atkrenta” per metus laiko po RA terapijos ir 15/44 (34 %) pacientų, „atkritusių” prabėgus daugiau nei metams nuo gydymo RA. Atsižvelgus į visus anksčiau išvardintus faktus, galima teigti, jog leukemogenezės mechanizmų bei ŪPL gydymo atsako detalesnis išaiškinimas yra vis dar aktualus ir reikalingas siekiant atrasti terapiją, kuri konkrečiu atveju labiausiai pasiteisintų.

Yra žinoma, jog atsparumas gydymui RA gali pasireikšti dėl PML-RAR α ligandą prijungiančiame domene atsiradusių taškinių mutacijų (Gallagher ir kt., 2002). Kitais atvejais – dėl susiformavusių slopinančių kompleksų, kurių įprastos farmakologinės RA dozės nepajėgia įveikti (t. y., disocijuoti nuo genų taikinių). Pavyzdžiui, tokius slopinančius kompleksus pritraukia PLZF-RAR α (Ablain ir The, 2014). Kadangi su RAR α sulieti baltymai pritraukia HDAC fermentus, o šie, savo ruožtu, ir kitus epigenetinius reguliatorius, ir būtent tai yra vienas svarbiausių ŪPL leukemogenezės mechanizmų, į HDAC slopiklius ir, apskritai, į epigenetinį pertvarkymą pradėta žiūrėti kaip į daug žadantį potencialios terapijos būdą.

Tolimesniuose skyriuose bus aptarti epigenetiniai vėžio išsivystymo aspektai, taip pat bus kalbama ir apie chromatinio modifikacijas. Didžiausias dėmesys bus skiriamas su darbo tema susijusioms histonų modifikacijoms, konkrečiai – acetilinimui ir metilinimui.

2.3. Epigenetiniai vėžio išsivystymo aspektai ir epigenetinė terapija

Jau kuris laikas pripažįstama, jog vėžio išsivystymą ir eigą nulemia ne vien tik genetinės mutacijos. Labai svarbų vaidmenį atlieka ir epigenetiniai pakitimai (šie reguliuoja genų raišką nekeisdami DNR grandinės sekos) (apžv. Dawson ir Kouzarides, 2012). Priešingai nei genetinės mutacijos, kurios praktiškai yra neištaisomos ar sunkiai ištaisomos, epigenetiniai pokyčiai yra grįžtami (apžv. Yoo ir Jones, 2006; You ir Han, 2014), o tai, savo ruožtu, sudaro prielaidą ir farmakologiniam įsikišimui (Sawan ir Herceg, 2010).

Paskutiniu metu prabilta, jog vėžys gali būti traktuojamas ir kaip metabolinė liga (Seyfried ir kt., 2014). Šios teorijos šalininkai teigia, jog vėžinėse ląstelėse aptinkamas genomo nestabilumas gali būti sutrikusi vėžinių ląstelių metabolizmo išdava, o ne atvirkščiai. Visgi somatinių mutacijų ir epigenetinių sutrikimų reikšmė vėžio išsivystymui kol kas nenuneigiama (apžv. Coller, 2014).

2.3.1. Chromatino modifikacijos

Eukariotų chromatinas – tai ilga polimerinė struktūra, sudaryta iš genomines DNR, bazinių baltymų histonų (H1, H2A, H2B, H3 ir H4) bei nehistoninių baltymų. Chromatinui būdingas krūvis, būtent dėl to ši struktūra gali būti lengvai kintanti (pvz., kovalentiškai modifikuojama). Laikoma, jog chromatinas labiau panašus į „skystą“, o nei į statiška, „kietą“ medžiagą (Maeshima ir kt., 2016). Gyvo vaizdinimo metodais (fluorescencine koreliacine spektroskopija bei HILO mikroskopija) atskleista, kad chromatinas – ypatingai dinamiška struktūra (Hihara ir kt., 2012). Savo ruožtu, tokie dinaminiai pokyčiai yra labai svarbūs genomo funkcijų reguliavimui (chromatino pokyčiai nulemia DNR „prieinamumą“ ir taip reguliuoja genų raišką).

Itin svarbų vaidmenį reguliuojant chromatino dinaminis kismus atlieka kovalentinės histonų modifikacijos, kurios aptinkamos histonų N-galuose (nuo 15 iki 38 a. r.). Šiuo metu yra išskiriamos aštuonios pagrindinės histonų potransliacinės modifikacijos: fosforilinimas (S, T), acetilinimas (K), metilinimas (K, R, Q), ubikvitilininimas (K), sumoilininimas (K), ADP-ribozilininimas, glikozilininimas ir karbonilininimas. Histonų modifikacijos ir jų reikšmė apžvelgta 2.3.1.1 lentelėje. Visgi reikėtų pažymėti, jog nauji, ar gerokai patobulėję, proteomikos, genomikos bei cheminės biologijos metodai suteikia tyrėjams galimybę aptikti vis naujų histonų potransliacinių modifikacijų (Arnaudo ir Garcia, 2013). Pateiktoje lentelėje, be jau minėtų, įvardinta ir keletas kitų, ne taip dažnai pasitaikančių, histonų modifikacijų.

2.3.1.1 lentelė. Histonų modifikacijos ir funkcinė jų reikšmė (pagal Kouzarides, 2007; Vollmuth ir Geyer, 2010; Lazarus ir kt., 2011; Monneau ir kt., 2013; Unoki ir kt., 2013; Tessarz ir kt., 2014; Flynn ir kt., 2015).

Histonų modifikacijos	Nomenklatura	Chromatiną atpažįstantis motyvas	Priskiriama funkcija
Acetilinimas	K-ac	Bromodomenų tandemas, PHD pirštai	Genų raiška, pažaidų taisymas, replikacija, kondensacija
Metilinimas (lizinų)	K-me1, K-me2, K-me3	Chromodomenai, Tudor domenai, MBT, SET ir PWWP domenai, PHD pirštai ir WD40/β propeleris	Genų raiška, pažaidų taisymas
Metilinimas (argininų)	R-me1, R-me2a, R-me2s	Tudor domenai	Genų raiška
Metilinimas (glutaminų)	Q-me	Nežinoma	Genų raiška
Fosforilinimas (serino ir treonino)	S-fos, T-fos (angl. S-ph, T-ph)	14-3-3, BRCT	Genų raiška, pažaidų taisymas, kondensacija
Fosforilinimas (tirozino)	Y-ph	SH2	Genų raiška, pažaidų taisymas
Ubikvitilinimas	K-ub	UIM, IUIM	Genų raiška, pažaidų taisymas
Sumoilinimas	K-su	SIM	Genų raiška, pažaidų taisymas
ADP ribozilinimas	E-ar	Makro domenai, PBZ domenai	Genų raiška, pažaidų taisymas
Deimininimas (citrulininimas)	R > Cit	nežinoma	Genų raiška ir dekonkondensacija
Prolino izomerizacija	P-cis > P-trans	PPI	Genų raiška
Krotonilinimas	K-cr	Bromodomenai	Genų raiška
Propionilinimas	K-pr	Bromodomenai	Genų raiška
Butirilnimas	K-bu	Bromodomenai	Genų raiška
Formilinimas	K-fo	Nežinoma	Genų raiška
Hidroksilinimas	Y-oh	JmjC	Genų raiška
O-GlcNAcilinimas (serino ir treonino)	S-GlcNAc, T-GlcNAc	TPR	Genų raiška

Išskiriami bent du mechanizmai, kuriais epigenetinės modifikacijos gali prisidėti prie vėžio atsiradimo ar jo progresavimo. Yra žinoma, jog tam tikri epigenetiniai pokyčiai gali aktyvuoti onkogenų ir sumažinti vėžį slopinančių genų raišką. Pavyzdžiui, parodyta, jog vėžinių susirgimų atveju vėžio slopiklio p53 geno promotorinėse srityse aptinkamos genų raišką nuslopinančios histonų modifikacijos H3K9me3, H3K27me3 ir H4K20me3 (Soto-Reyes ir Targa, 2010). Be to, epigenetinės modifikacijos gali turėti įtakos genomo stabilumui ir chromosomų segregacijai. Pavyzdžiui, homozigotiniai mutantiniai pelių embrionai, neturintys PR-Set7 (H4K20me1 histonų metiltransferazės) geno,

neišgyvena, anksti miršta, nes sutrinka jų ląstelės ciklas, pasireiškia dauginės DNR pažaidos ir sutrinka mitozinių chromosomų kondensacija (Oda ir kt., 2009). Parodyta, jog pelėms, kurių SUV39 baltymas (atsakingas už H3K9 metilinimą) yra defektyvus, sumažėja H3K9me2/3 lygis, yra būdingas genomo nestabilumas ir padidėja vėžinių susirgimų rizika (Peters ir kt., 2001).

Kalbant apie vėžio epigenetiką, būtina pažymėti, jog vėžio atsiradimui įtakos turi ne tik histonų modifikacijų pokyčiai, bet ir kitų epigenetinių mechanizmų, tokių kaip DNR metilinimo ir miRNR raiškos, pakitimai. Kadangi šiame darbe nagrinėjama tik cheminių junginių, kurių taikiny – histonus modifikuojantys fermentai, galimas pritaikymas leukemijos terapijai, DNR metilinimo ir miRNR raiškos įtaka vėžėjimo procesams, patys fermentai bei modifikacijų sąveikos plačiau nebus nagrinėjamos.

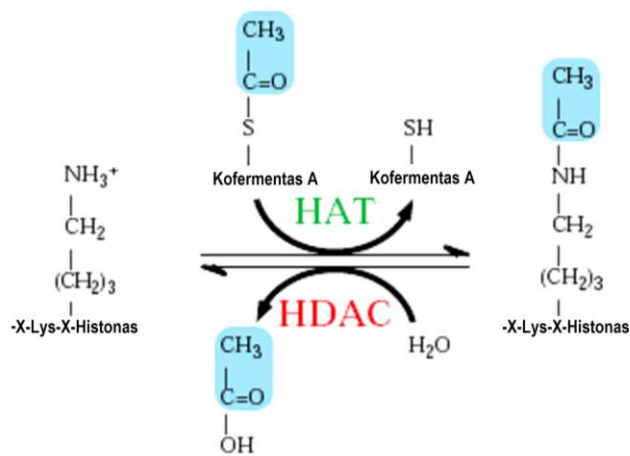
2.3.1.1. Histonų acetiltransferazės (HAT)

Itin svarbus vaidmuo reguliuojant chromatiną tenka histonų acetilinimui. Daugybė *in vitro* atliktų eksperimentų parodė, jog acetilinus histonų N-galuose esančias lizino liekanas yra neutralizuojamas teigiamas jų krūvis, nutraukiami elektrostatiniai ryšiai tarp histonų ir DNR fosfatinių grupių. Manoma, jog acetilinimas gali pakeisti ir sąveiką tarp histonų, esančių skirtingose nukleosomose, taip pat histonų bei reguliacinių baltymų ryšį. Atitinkamai dėl to pakinta ir chromatiną konfigūracija (apžv. Horikoshi, 2013).

HAT tipai. Išskiriamos 2 pagrindinės histonų acetilazės klasės: citoplazminės acetilazės HAT-B ir branduolinės acetilazės HAT-A (Horikoshi, 2013). Atsižvelgiant į sekos panašumą, žinomos daugialąsčių organizmų HAT-A gali būti skirstomos į kelias atskiras grupes. GNAT (angl.: *Gcn5-related N-acetyltransferases*) šeimos histonų acetilazės dalyvauja ląstelės augimo procesuose. MYST (Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) fermentai dalyvauja genų raiškos kontrolėje, taip pat ląstelės augimo ir išgyvenimo procesuose. Likusios HAT šeimos yra gerokai mažesnės. Išskiriamos

p300/CBP HAT, transkripcijos veiksnių HAT (joms būdingas TAF250 domenas) ir steroidinių receptorių koaktyvatoriai / branduolio receptorių koaktyvatoriai – NCoA šeima. (apžv. Wapenaar ir Dekker, 2016).

Veikimo principai. Histonų acetilinimas – procesas, kurio metu acetilo grupė nuo Acetil-KoA pernešama ant $\epsilon\text{-NH}_3^+$ lizino grupės histonų N-galuose (2.3.1.1.1 pav.). Histonų acetilazės modifikuoja tik keletą konkretaus baltymo lizino liekanų. Parodyta, jog histonų acetilazės atpažįsta motyvą GK (GKXXP taip pat įvardijama kaip galima atpažinimo seka). Reikia paminėti, jog skirtingai nei kiti klasikiniai fermentų substratai, didžioji dauguma N^ϵ -acetilintų baltymų stabiliai susijungia su juos modifikuojančiomis acetiltransferazėmis. Tokiu būdu konkrečioje vietoje yra padidinama substrato koncentracija ir nulemiamas substrato specifiškumas (apžv. Yang ir kt., 2004; Yuan ir Marmorstein; 2013).



2.3.1.1.1 pav. Acetil-KoA – acetilo grupės donoras. Histonų acetiltransferazės perkelia acetilo liekaną ant $\epsilon\text{-NH}_3^+$ lizino grupės histonų N-galuose. Atvirkštinę reakciją katalizuoja histonų deacetilazės (pagal Kuo ir Allis, 1998).

Žinoma, kad HAT veikimas yra itin dinamiškas. Pavyzdžiui, HAT ir HDAC fermentai geba greitai pakeisti H3K4 me3 acetilinimo lygį. (Crump ir kt., 2011). Reikia pažymėti, jog acetilinimas – labai trumpalaikė žymė. Manoma, jog ši žymė yra itin svarbi tiksliai genų raiškos laiko kontrolei. Įdomu tai, kad neseniai žmogaus ląstelėse aptikta ir ilgalaikių acetilinimo žymių (H2AK13, H2AK36, H3K4, H2AK15, H3K79, H3K56, H3K122) (Zheng ir kt., 2013). Visgi šių ilgalaikių žymių funkcija dar nėra iki galo aiški.

Dauguma histonų acetiltransferazių randamos kompleksuose su kitais baltymais, reguliuojančiais jų katalizinį aktyvumą ir / ar specifiškumą

substratui (Marmorstein ir Zhou, 2014). Labai svarbi ir įdomi HAT fermentų ypatybė ta, jog paprastai jie nėra specifiški konkreitiems lizinams, tačiau, bendrai paėmus, šių fermentų funkcijos yra specifiškos. Pavyzdžiui, tiek SAGA, tiek elongatoriaus kompleksas acetilina histonus H3K9 ir K14 padėtyse. Visgi skiriasi šių fermentų veikimo vieta: elongatoriaus kompleksas veikia koduojančiuose regionuose, o SAGA – promotorinėse srityse (Wittschieben ir kt, 1999). Tai parodo, koks svarbus HAT veikimui yra tinkamas jų nukreipimas prie „taikinio“. Nekatalitiniai HAT fermentų domenai yra atsakingi už šių baltymų nukreipimą link substrato. Chromodomenai, bromodomenai, PHD pirštai, Tudor, WD40 – vieni svarbiausių domenų, atsakingų už HAT gebėjimą atpažinti substratą (Swygert ir Peterson, 2014).

Histonų acetiltransferazės acetilina ne tik tam tikras lizino liekanas histonų N-galuose, tačiau geba vykdyti ir nespecifinį viso genomo acetilinimą. Parodyta, jog bendrasis acetilinimas, kaip ir specifinis, aktyvuoja genų raišką (Galdieri ir Vankura, 2012). Lizino ϵ -amino grupė eukariotinėse ląstelėse taip pat gali būti metilinama ar modifikuojama ubikvitino ar į jį panašių baltymų (pvz., NEDD8 ar SUMO). Pažymėtina, jog skirtingos epigenetinės modifikacijos gali konkuruoti tarpusavyje (2.3.1.1 lentelė).

2.3.1.2. Histonų deacetilazės (HDAC)

HDAC tipai. Histonų deacetilazės – evoliuciškai konservatyvūs baltymai, aptinkami visuose organizmuose nuo archebakterijų iki žmogaus. Žmogaus HDAC skirstomos į nuo Zn-priklausomas (I ir II ir IV klasės) ir nuo Zn-nepriklausomas, NAD^+ -priklausomas (III klasės fermentai) (apžv. Qiu ir kt., 2017).

Iš viso priskaičiuojama 18 žmogaus HDAC. I klasės histonų deacetilazėms (42–45 kDa) priklauso HDAC1, HDAC2, HDAC3 ir HDAC8. Nors anksčiau buvo priimta manyti, jog I HDAC klasės fermentai yra funkciškai aktyvūs tik branduolyje, išsamesni tyrimai parodė, kad šie fermentai gali veikti ir citoplazmoje bei tam tikrose ląstelių organelėse. HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 ir HDAC10, priklausančios II klasei

(120–130 kDa), veikia ir branduolyje, ir citoplazmoje. IV histonų deacetilazių klasei priskiriama tik viena histonų deacetilazė – HDAC11. Šis fermentas taip pat aptinkamas tiek ląstelės branduolyje, tiek ir citoplazmoje. III histonų deacetilazių klasė – konservatyvi, nuo NAD^+ priklausoma, Sir2 deacetilazių šeima. Žmogaus ląstelėse iš viso aptinkami septyni sirtuinai (SIRT1–7). Įdomi šių fermentų savybė ta, jog jie pasižymi ne tik histonų deacetilaziniu, tačiau ir mono-ADP-riboziltransferaziniu aktyvumu (apžv. Seto ir Yoshida, 2014).

Veikimo principai. HDAC slopina genų raišką nuo lizino liekanų, esančių histonų uodegose, pašalindamos krūvį neutralizuojančią acetilo grupę. Acetilo grupė pašalinama naudojant krūvio pakeitimo mechanizmą (I, II ir IV HDAC klasės). Sirtuinų veikimo mechanizmas skiriasi: reakcijos metu kaip kofaktorius šiems fermentams reikalingas NAD^+ . Nuo NAD^+ priklausomo acetilo grupės pašalinimo metu yra nutraukiama nikotinamido–ribozės glikozidinė jungtis ir gaunama O-acetil-ADP-ribozė bei laisva lizino liekana. Nikotinamidas, vienas iš šalutinių šios reakcijos produktų, slopina sirtuinų veikimą (apžv. Seto ir Yoshida, 2014).

Reikia pasakyti, jog didžiajai daugumai minėtų fermentų specifiskumas konkrečioms acetilo grupėms nėra būdingas. Visgi parodyta, jog kai kurios HDAC sąveikauja tik su tam tikrais histonais. Pavyzdžiui, HDAC8 deacetilina histonus H3 ir H4, o HDAC11, manoma, specifiskai deacetilina histonus H3K9 ir H3K14 (Seto ir Yoshida, 2014). Nors HDAC veikia antagonistiskai HAT fermentams (dėl ko išsaugomas Lys $\epsilon\text{-NH}_3^+$ grupės krūvis, susilpnėja transkripcijos veiksmų bei koaktyvatorių sąveika su acetilvizinu), žinoma, kad acetilo grupės pašalinimas gali blokuoti genų raišką ir dėl SANT domeną turinčių baltymų jungimosi (SANT domenas – motyvas, aptinkamas daugelyje korepresinių baltymų, kurie atpažįsta nemodifikuotus histonus) (Shahbazian ir Grunstein, 2007).

Anksčiau manyta, jog HDAC negeba tiesiogiai prisijungti prie DNR ar histonų baltymų, todėl tam, kad nutildytų genų raišką, šie fermentai turi sąveikauti su kitais baltymais, kurie juos nukreiptų prie atitinkamų genų sekų.

Pavyzdžiui, HDAC1 ir HDAC2 yra randamos stabiluose kompleksuose, tokiuose kaip Sin3, NuRD ar CoREST (apžv. Seto ir Yoshida, 2014). Visgi parodyta (Li ir kt., 2014), jog HDAC1 (taip pat ir HAT p300) geba jungtis prie chromatinio ir tiesiogiai.

Reikėtų pažymėti, jog ne tik histonai yra histonų deacetilazių substratai. Šie fermentai pašalina ir transkripcijos veiksnių (pvz., p53, E2F, GATA1) acetilinimą. Tai parodo HDAC gebėjimą keisti genų raišką, pasitelkiant ir kitokius mechanizmus nei vien tiesioginį reguliavimą per histonus. Histonų deacetilazės taip pat aptinkamos sąveikaujančios ir su baltymais, kurie svarbūs ląstelės ciklo valdymui bei programuotos ląstelių žūties procesams, ląstelių metabolizmui, DNR pažeidimų taisymui, transkripcijai, RNR brendimui, transliacijai ir chromatinio struktūros palaikymui (apžv. Seto ir Yoshida, 2014).

HDAC reguliavimo sutrikimas vėžinių susirgimų atveju. Vėžiniams susirgimams yra būdingi acetilinimo pokyčiai. Parodyta, kad vėžio ląstelės praranda histono H4 K16 acetilinimą (Fraga ir kt., 2005). Yra žinoma, jog patologijų atveju padidėja HDAC raiška. Pavyzdžiui, prostatos vėžio ląstelėse stebimas HDAC1 raiškos sustiprėjimas (Halkidou ir kt., 2004). Skrandžio, tiesiosios žarnos karcinomos bei gimdos kaklelio displazijos atveju taip pat pastebima, jog HDAC2 raiška išauga (Huang ir kt., 2005; Song ir kt., 2005; Hua ir kt., 2014). HDAC baltymų kiekio padidėjimas aptiktas ir leukemijos blastuose (Tickenbrock ir kt., 2011). Be to, kai kurių leukemijų, tarp jų ir ŪPL, atveju, dėl sąveikos su susiformavusiais chimeriniais baltymais, gali sutrikti (sustiprėti) HDAC pritraukimas prie tam tikrų genų sekų (Melnick ir Licht, 1999). Tad HDAC slopiklių naudojimas – patraukli gydymo strategija, padedanti atkurti sumažėjusią vėžio slopiklių genų raišką, taip pat indukuojanti vėžio ląstelių diferenciaciją bei apoptozę (apžv. Quintás-Cardama ir kt., 2011; Stahl ir kt., 2016).

HDAC slopikliai. HDAC slopiklių priešvėžinis veikimas gali būti paaiškintas ne tik DNR struktūros „atpalaidavimu“ bei nuslopintų genų raiškos

atkūrimu. Nurodoma, kad, dėl HDACi veiklos išaugus histonų hiperacetilinimui, gali būti sutrikdomas genomo stabilumas, dėl ko galiausiai ląstelės ciklas sustabdomas kritiniuose taškuose (Zheng ir kt., 2008).

Parodyta, jog poveikiai HDAC slopikliais sumažina antiapoptozinių baltymų (pvz., XIAP, survivino ir Bcl-w) ir sužadina proapoptozinių baltymų (pvz., Bim, Bmf ir Noxa) raišką. Be to, aktyvuojami ir mirties receptorių signaliniai keliai. Yra žinoma, kad kai kurie HDACi aktyvuoja nuo ciklinų priklausomų kinazių (CDK) slopiklį p21 ir taip reguliuoja ciklinus A bei D. Taip pat parodyta, jog poveikiai HDACi indukuoja aktyvių deguonies formų gamybą. Yra žinoma, jog HDAC slopikliai geba tiesiogiai indukuoti ir DNR pažaidų atsiradimą bei nuslopinti šių pažaidų taisymą (Bose ir kt., 2014). Įdomu ir tai, kad HDAC slopikliai aktyvuoja I ir II klasės HMC baltymų, kostimuliatorių (CD40, CD80 ir CD86), viduląstelių adhezijos molekulių (ICAM1 ir I bei II tipo interferonų) genų raišką. Taigi, aplinkoje esantys HDAC slopikliai padidina vėžinių ląstelių jautrumą leukocitams. Be to, sparčiai besivystančiam navikui būtinas nenutrūkstamas aprūpinimas deguonimi ir maisto medžiagomis, t. y., reikalingas kraujagyslių tinklas. TSA (Trichostatinas A, *Streptomyces hygroscopicus* fermentacijos produktas) nuslopina dėl hipoksijos išaugusią VEGF (kraujagyslių endotelio augimo veiksnio) geno raišką. Tokiu būdu *in vitro* ir *in vivo* nuslopinama ir angiogenezė (apžv. Mai ir kt., 2005).

HDAC (I ir II klasės) slopikliai skirstomi į kelias grupes: trumpagrandes riebiąsias rūgštis (pvz., 4-fenilbutiratas, valproinė rūgštis), hidroksamines rūgštis (tokios kaip SAHA, piroksamidas, TSA ir CHAPs), ciklinius tetrapeptidus (pvz., trapoksinas, apicidinas ir depsipeptidas (kitaip žinomas kaip FK-228 ar FR901228)), aminobenzamidus (pvz., entinostatas) ir hibridines molekules (apžv. West ir Johnstone, 2014).

Visgi šiuo metu dar nėra vienas HDACi nėra oficialiai patvirtintas kaip vaistas, skirtas gydyti ŪML (pagal JAV maisto ir vaistų administracijos (MVA; angl., *Food and Drug Administration – FDA*) duomenis; paskutinį kartą informacija atnaujinta 2017 m. rugsėjo 14 d.). Kalbant bendrai apie

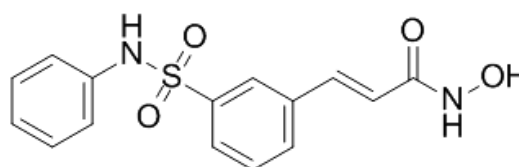
hematologinius susirgimus, kol kas tik trys HDACi: varinostatas (*Zolinza*), romidepsinas (*Istodax*) ir belinostatas (*Beleodaq*) yra patvirtinti MVA kaip vaistai nuo kai kurių T ląstelių limfomų, panabinostatas (*Farydak*) nuo daugybinės mielomos (apžv. Mottamal ir kt., 2015; apžv. Kim ir kt., 2015; apžv. Wouters ir Delwel, 2016). Dar keletas HDAC slopiklių yra įtraukta į šiuo metu vykstančius hematologinių susirgimų klinikinius tyrimus (klinikinių tyrimų identifikacijos *ClinicalTrials.gov* duomenų bazėje Nr. NCT01693601, NCT02576496, NCT01873703 (informacija atnaujinta 2017 m. rugsėjo 20 d.)). Svarbu paminėti, jog šiuo metu yra vykdomi I stadijos klinikiniai tyrimai, kurių metu bus įvertintas HDACi varinostato kartu su DNMTi decitabinu gebėjimas sužadinti pasikartojusios / sunkiai gydomos ŪML atsaką į poveikį įprastais chemoterapijos vaistais (klinikinio tyrimo identifikacijos Nr. NCT02412475). Toliau plačiau aptarsime šiame darbe naudotą HDACi – belinostatą.

Belinostatas ((*2E*)-*N*-Hidroksi-3-[3-(fenilsulfamoil)fenil]prop-2-enamidas; *PubChem CID*: 6918638), kitaip dar žinomas kaip PXD101 – hidroksamatų tipo cheminis junginys, slopinantis I ir II HDAC klasės fermentų veiklą. Parodyta, jog šis HDAC slopiklis geba sustabdyti vėžinių ląstelių proliferaciją ir indukuoti jų apoptozę (Khan ir kt., 2008; Havas ir kt., 2016). Šiuo metu belinostatas oficialiai patvirtintas periferinės T-ląstelių limfomos gydymui, taip pat atliekami ir *in vitro* bei klinikiniai tyrimai, įvertinantys šio cheminio junginio poveikį karcinomai bei kitiems, hematologiniams ar standiesiems, navikams (Damaskos ir kt., 2016; Kusaczuk ir kt., 2016; Puvvada ir kt., 2016; Campbell ir Thomas, 2017). Tiriamas ir belinostato pritaikomumas chemoterapijoje veikiant kartu su karboplatina (angl.: *carboplatin*) (apžv. Mottamal ir kt., 2015). Pažymėtina, jog, vertinant poveikį standiesiems navikams, geresnių rezultatų pasiekta naudojant belinostatą ne vieną, o kombinacijoje kartu su įprastais chemoterapiniais vaistais (Grassadonia ir kt., 2013; Thomas ir kt., 2014; Vitfell-Rasmussen ir kt., 2016). Belinostatas taip pat naudotas ir monoterapijos tikslais, tiriant poveikį naujai diagnozuotai ŪML (Kirschbaum ir kt., 2014). Visgi,

naudojamas vienas, belinostatas nepasižymėjo stipriu efektyvumu. Kita vertus, parodyta, kad belinostatas kombinacijoje su proteosomų slopikliu bortezomibu (angl.: *bortezomib*) indukuoja ŪML ir ŪLL (ūminės limfocitinės leukemijos) ląstelių bei pirminių blastų apoptozę, tačiau yra netoksiškas normalioms CD34(+) ląstelėms (Dai ir kt., 2011). Atlikti ir I stadijos belinostato bei bortezomibo kombinacijos poveikio pasikartojusiai / sunkiai gydomai ŪML ir mielodisplaziniam sindromui klinikiniai tyrimai (klinikinio tyrimo identifikacijos *ClinicalTrials.gov*

duomenų bazėje Nr. NCT01075425; tyrimo rezultatai dar nepaskelbti).

Belinostato struktūrinė formulė pateikta 2.3.1.2.1 pav.

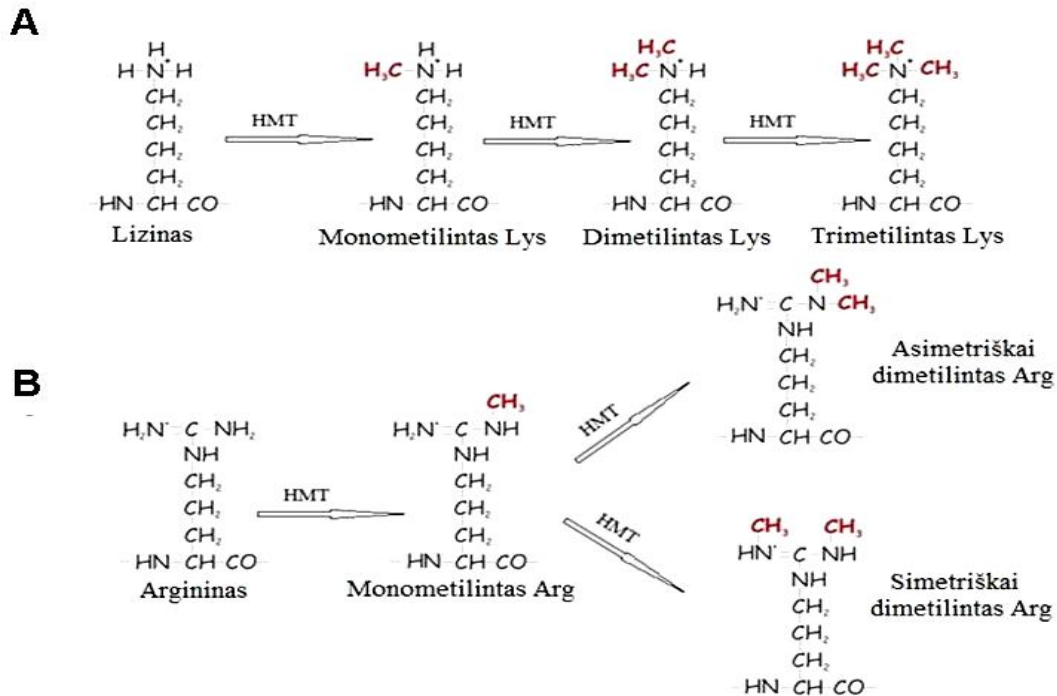


2.3.1.2.1 pav. Belinostato struktūrinė formulė (pagal MedChem Express).

2.3.1.3. Histonų metiltransferazės (HMT)

Histonų metilinimas – dar viena epigenetinė modifikacija, itin svarbi genų raiškos reguliavimui. Kaip ir acetilinimas, histonų metilinimas turi įtakos chromatino kompaktiškumui. Metilinamos lizino (Lys), arginino (Arg) ar glutamino (Gln) aminorūgščių liekanos. šiuo metu žinoma, jog glutaminas metilinamas tik histone H2A Q104 padėtyje (kalbama apie žmogų). Ši modifikacija siejama su rDNR genų raiškos reguliavimu branduolėlyje (Leonhardt ir Hake, 2014; Tessarz ir kt., 2014). Argininas gali būti metilinamas trimis skirtingais būdais: mono- ir di- padėtyse, simetriškai arba asimetriškai (apžv. Cheng, 2014). Lizinas, savo ruožtu, gali būti mono-, di- arba trimetilinamas (2.3.1.3.1 pav.). Parodyta, jog histonų H3 ir H4 metilinamas yra specifiškas. Lizino metilinamas histonuose H3 vyksta K4, K9, K14, K27, K36, K79, o histonuose H4 – tik K20 ir K59 padėtyse. Įprastai histono H3 metilinimas K4, K36 ir K79 padėtyse siejamas su euchromatinu ir genų raiškos aktyvavimu, o metilinimas histono H3 K9, K27 ir histono H4 K20 padėtyse – su heterochromatinu bei genų raiškos nuslopinimu. Tad,

priklausomai nuo to, kurie lizinais histonuose metilinami, šis procesas gali aktyvuoti arba nuslopinti genų raišką (Lee ir kt., 2005).



2.3.1.3.1 pav. Lizino (A) ir arginino (B) metilinimas (pagal Lee ir kt., 2005).

HMT tipai ir veikimo principai. Kaip jau minėta, HMT gali būti klasifikuojamos pagal tai, kokį substratą modifikuoja – glutamino, arginino ar lizino aminorūgščių liekanas. Pastarosios HMT dar išskiriamos į dvi grupes: SET domeną turinčias lizino HMT ir SET domeno neturinčias lizino HMT.

SET (angl. *Su(var)3-9, Enhancer of zeste, Tritorax*) – domenas, kuriame yra fermento aktyvusis centras. SET prijungia kofaktorių S-adenozil-L-metioniną (AdoMet), kuris histonų metiltransferazių (visų HMT, taip pat ir neturinčių SET domeno) naudojamas kaip metilo grupės donoras (apžv. Binda, 2013). Metilinimo procesui taip pat reikalingi ir prieš-SET bei po-SET domenai (sekos, kurios yra išsidėsčiusios aplink SET domeną ir pasižymi dideliu cisteino kiekiu). Minėti domenai reguliuoja fermento aktyvumą ir specifiškumą. Lizino HMT, neturinčios SET domeno, vietoj jo naudoja Dot1 baltymą, kuris, skirtingai nei SET domeną turinčios HMT, geba metilinti ne N-galo, o pačios histonų globulės lizinus (Stulemeijer ir kt., 2015). Argininui

specifiškos HMT (angl.: *PRMT – protein arginine methyltransferases*) skiriamos į dvi grupes. Vienos iš jų katalizuoja arginino monometilinimą ir asimetrišką metilinimą, kitos – monometilinimą ir simetrišką metilinimą (apžv. Hamamoto ir Nakamura, 2016).

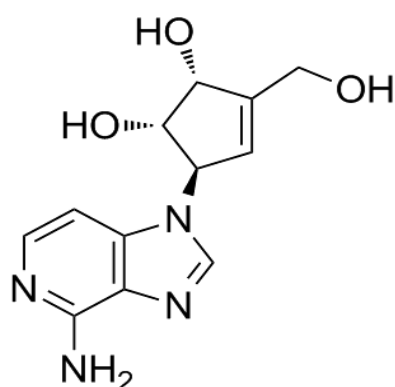
HMT reguliavimas vėžinių susirgimų atveju. Tyrimais (Islam ir kt., 2011; Vieira ir kt., 2013; Pires-Luís ir kt., 2015) nustatyta, jog tam tikrų vėžinių susirgimų atveju pakinta HMT reguliavimas. Pavyzdžiui, Fraga ir kt. (2005) parodė, jog vėžio ląstelėms yra būdingas histono H4 Lys20 trimetilinimo (kartu ir Lys16 acetilinimo) sumažėjimas. Toliau tekste plačiau bus aptarta su darbo tema susijusi histonų metiltransferazė EHMT2 ir baltymų kompleksas PRC2.

Žmogaus **PRC2** kompleksą sudaro penki baltymai: EZH2, SUZ12, EED, RbAp46/48 ir AEBP2. Pagrindinė komplekso funkcija – histono H3 K27 trimetilinimas ir genų raiškos nuslopinimas. Paminėtina, kad PRC2 taip pat metilina ir H2B K120, o ši modifikacija, savo ruožtu, užkerta kelią tolimesniam H2B ubikvitilinimui. Atlikti tyrimai pademonstravo, jog PRC2 taikiniai – transkripcijos veiksniai, nulemiantys ląstelių likimą bei signalinės molekulės, reguliuojančios diferenciacijos ir vystymosi procesus (Zhou ir kt., 2011). Parodyta, jog PRC2 reguliacija daugelio vėžio tipų atveju būna sutrikusi. Stipriai išaugusi EZH2 geno ir baltymo raiška siejama su daugeliu vėžinių susirgimų: stemplės, plaučių, šlapimo pūslės, krūties ir prostatos vėžiu, limfoma, melanoma (Takawa ir kt., 2011; Tan ir kt., 2014; Abdalkader ir kt., 2016; Fisher ir kt., 2016; Liu ir kt., 2016). EZH2 – katalitinis PRC2 komplekso subvienetas. Katalitiniu aktyvumu pasižymi šio baltymo C-galo SET domenas. Visgi fermentiniam aktyvumui yra būtina ir EZH2 sąveika su kitais dviem komplekso nariais – SUZ12 ir EED. Kalbant apie EZH2 sąveiką su kitais baltymais, įdomu tai, kad EZH2 geba sąveikauti su histonų deacetilazėmis HDAC1 bei HDAC2 ir tokiu būdu sustiprinti genų raiškos slopinimą (Fiskus ir kt., 2009).

EHMT2 metilazė (dar kitaip vadinama G9a) monometilina arba dimetilina euchromatino histono H3 liziną 9 padėtyje. Ši modifikacija pritraukia papildomus epigenetinius reguliatorius ir prisideda prie genų raiškos nuslopinimo. Parodyta, jog H3K9me1 ir H3K9me2 yra svarbūs ankstyvajai embriogenezei, imprintingo palaikymui ir DNR metilinimo kontrolei (Auclair ir kt., 2016). Būtina paminėti, kad EHMT2 ne tik metilina H3K9, bet skatina ir H3K27 metilinimą (Pan ir kt., 2015). EHMT2 raiškos sutrikimas aptiktas hepatoceliulinės karcinomos, neuroblastomos, šlapimo pūslės ir plaučių vėžio atvejais (Kondo ir kt., 2007; Cho ir kt., 2011; Lu ir kt., 2013).

HMT slopikliai. Neseniai atlikti DOT1 slopiklio EPZ-5676 I stadijos klinikiniai tyrimai ir įvertintas šio junginio poveikis ūminei limfoidinei ir mieloidinei leukemijai bei mielodisplaziniam sindromui (klinikinio tyrimo identifikacijos *ClinicalTrials.gov* duomenų bazėje Nr. NCT02141828; tyrimas baigtas 2016 m.). Kitas HMTi, EZH2 slopiklis EPZ-6438, šiuo metu yra tiriamas B ląstelių limfomos I stadijos klinikiniuose tyrimuose (klinikinio tyrimo identifikacijos *ClinicalTrials.gov* duomenų bazėje Nr. NCT01897571) (Licheva ir Bennani-Baiti, 2016).

Šiame darbe naudojome du naujus HMT slopiklius 3-deazaneplanociną A ir BIX-01294. Juos ir apžvelgsime kiek plačiau.

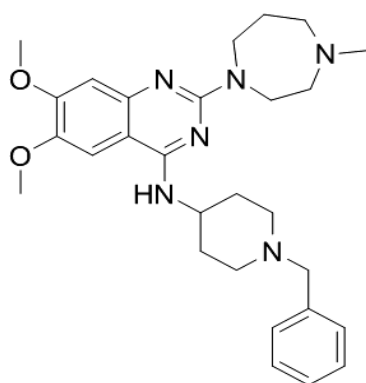


2.3.1.3.2 pav. DZNep struktūrinė formulė (pagal MedChem Express).

3-Deazaneplanocinas A (DZNep; 5R-(4-amino-1H-imidazo [4,5-c]piridin-1-il)-3 (hidroksimetil) -3-cyklopenten-1S,2R-diolis; *PubChem CID: 73087*) –adenozilhomocisteino hidrolazės ir histonų metiltransferazių slopiklis, gebantis nuslopinti histono H3 lizino 27 ir histono H4 lizino 20 trimetilinimą. DZNep – natūralaus antibiotiko neplanocino-A darinys, kuriame ribozę pakeičia

ciklopentenilo žiedas. Žinoma, jog šis HMTi aktyvuoja ciklo reguliatorių p16INK4a, p17KIP1 ir p27Kip1 raišką, sustabdo ląstelių ciklą G1 ciklo fazėje ir taip sukelia apoptozę (Nakagawa ir kt., 2014; Takashina ir kt., 2016). Tyrimais parodyta, jog DZNep indukuoja apoptozę išskirtinai vėžinėse, o ne sveikose ląstelėse (Tan ir kt., 2007). Be to, pastebėta, kad, aktyvuodamas nuslopintus genus, DZNep veikia kartu su HDAC ir DNMT (Zhou ir kt., 2011). 2.3.1.3.2 pav. pateikta DZNep struktūrinė formulė.

BIX-01294 (N-(1-benzilpiperidin-4-il)-6,7-dimetoksi-2-(4-metil-1,4-diazepan-1-il)kinazolin-4-aminas; *PubChem CID: 25150857*) – mažos molekulinės masės junginys, specifiskai slopinantis EHMT2 fermentinį aktyvumą ir sumažinantis H3K9me2 lygį. Parodyta, jog BIX-01294 efektyviai



2.3.1.3.3 pav. BIX-01294 struktūrinė formulė (pagal MedChem Express).

stabdo vėžinių ląstelių augimą (Cho ir kt., 2011; Cui ir kt., 2015; Ren ir kt., 2015). EHMT2 baltymo kiekio sumažėjimas sietinas su chromosominiu nestabilumu ir telomerų pakitimais, nulemiančiais ląstelių senėjimą (Kondo ir kt., 2007; Hinchcliffe, 2001), dėl to EHMT2 atrodo kaip patrauklus taikinyss vėžio terapijoje. 2.3.1.3.3 pav. pateikta BIX-01294 struktūrinė formulė.

2.3.1.4. Histonų demetilazės (HDM)

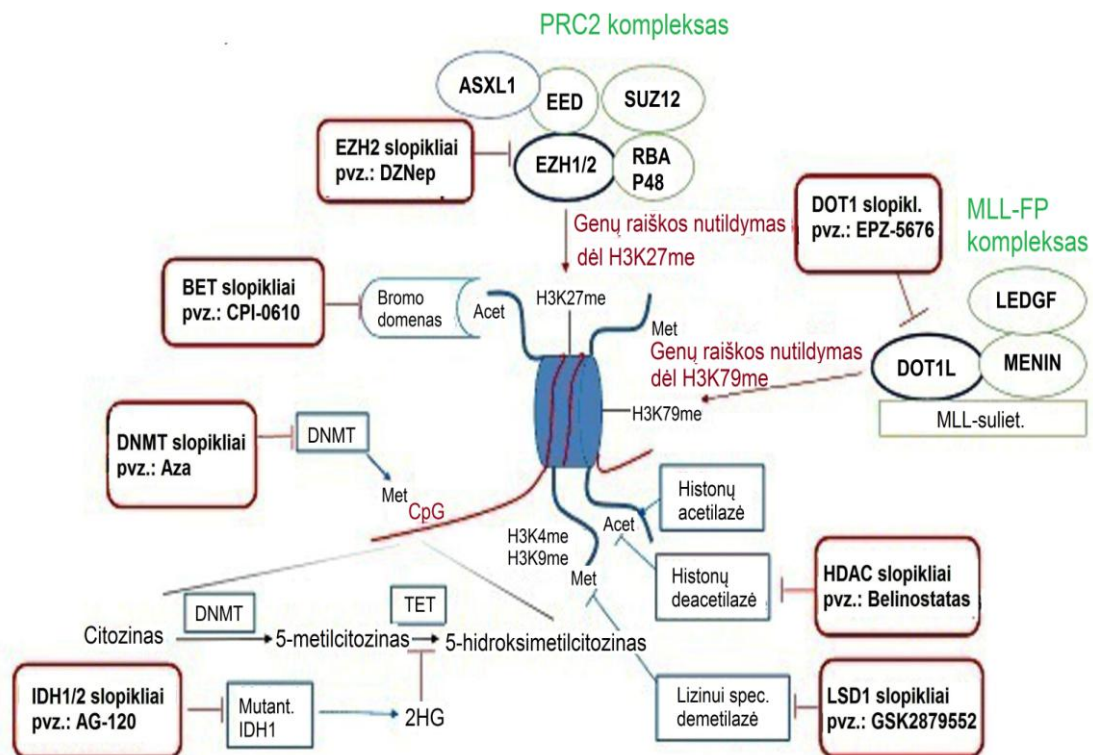
Ilgą laiką manyta, jog histonų metilinimas – negrįžtama modifikacija. Visgi kiek daugiau nei prieš dešimtmetį parodyta, kad histonus demetilinantys fermentai iš tiesų egzistuoja (Shi ir kt., 2004). Pagal veikimo mechanizmą histonų demetilazės skirstomos į dvi grupes: amino oksidazes, priklausančias nuo flavinadenindinukleotido (FAD) ir nuo Fe(II) bei α -ketoglutarato priklausančias dioksigenazes (Klose ir Zhang, 2007).

Histonų lizino demetilazės, konkrečiai demetilazė LSD1, siejamos su krūties, šlapimo pūslės, plaučių smulkiųjų ląstelių bei tiesiosios žarnos vėžio išsivystymu (Lim ir kt., 2010; Hayami ir kt., 2011). Manoma, kad LSD1 prisideda prie vėžio formavimosi tuo, jog panaikindama H3K4 metilinimą nutildo vėžio slopiklių genus. Be to, žinoma, jog LSD1 sąveikauja ir su HDAC korepresiniais kompleksais ir taip nutildo tam tikrų genų raišką (Huang ir kt., 2011; Vasilatos ir kt., 2013; Cao ir kt., 2017).

2.3.2. ŪML epigenetinė terapija

Kaip jau minėta anksčiau, epigenetinio reguliavimo sutrikimai kai kurių vėžinių susirgimų atveju, tarp jų įskaitant ir ŪML, prisideda prie ligos atsiradimo. Atsižvelgiant į tai, jog epigenetiniai pokyčiai gali būti grįžtami, imta ieškoti vaistų, kurie gebėtų sugrąžinti vėžines ląsteles iš „ligoto“ epigenetinio būvio į „normalų“. Tokiu būdu tikimasi, jog vėžio ląstelės atgautų sveikų ląstelių fenotipą. 2.3.2.1 pav. pateikta apibendrinta schema, iliustruojanti onkogenezės procesams svarbias epigenetines modifikacijas ir galimus terapijos taikinius.

Iki 2015 m. Europos komisija kaip epigenetiškai veikiančius vaistus, skirtus gydyti ŪML, patvirtino tik azacitidiną (*Vidaza*) ir decitabiną (*Dacogen*). JAV azacitidinas ir decitabinas oficialiai ŪML gydymui dar nėra patvirtinti, šiuo metu minėti vaistai yra naudojami mielodisplazinio sindromo gydymui. Azacitidino ir decitabino terapija taikoma vyresnio amžiaus asmenims (>65 m.), kurie yra per silpnos sveikatos, jog jiems būtų atlikta hematopoetinių kamieninių ląstelių transplantacija ir kurių kraujyje yra daugiau nei 30 % blastų (Xie ir kt., 2015; Pleyer ir kt., 2017). Šiais metais JAV MVA ŪML gydymui oficialiai patvirtino ir izocitrato dehidrogenazės 2 (IDH2) slopiklį idhifa (*Enasidenib*) (Kim, 2017). Žemiau pateiktoje 2.3.2.1 lentelėje apžvelgiama dalis ŪML gydymui skirtų epigenetiškai aktyvių medikamentų ir tiriamųjų preparatų bei aptariamas jų statusas ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose (2016 m. duomenys).



2.3.2.1 pav. Schema, iliustruojanti epigenetines modifikacijas ir potencialius terapijos taikinius (pagal Kim ir kt., 2015).

2.3.2.1 lentelė. Epigenetinei ŪML terapijai naudojami medikamentai ir tiriamieji preparatai bei jų tyrimų stadijos (pagal Wouters ir Delwel, 2016).

Epigenetinio regulatoriaus klasė	Taikinys	Junginys /-iai	Tyrimų stadija
DNR metiltransferazės	DNMT	Azacidinas Decitabinas Tikslingai kuriami nauji slopikliai	Patvirtinta Patvirtinta Ikiklinikiniai ir klinikiniai
Metilinimo regulatoriai	IDH1, IDH2	Mutantinio IDH1/2 slopikliai	Klinikiniai tyrimai junginių IDH305 (NCT02381886), AG-221 (NCT01915498) ir AG-120 (NCT02074839).
Histonų lizino acetiltransferazės	CREBBP (CBP) EP300 (p300)	CREBBP slopikliai EP300 slopikliai	Ikiklinikiniai tyrimai Ikiklinikiniai tyrimai
Histonų deacetilazės	HDAC	HDAC slopikliai	Keletas klinikinių tyrimų, dažniausiai HDACi derinant su kitais vaistais (su DNMTi (pvz., NCT01617226 ir NCT00867672), su chemoterapiniais junginiais (pvz., NCT01802333)) arba naudojant kartu su alogenine kaulų čiulpu transplantacija (pvz., NCT01451268)
Histonų acetilinimą atpažįstantys	Bromodomeną turintys baltymai (BET baltymai)	BET slopikliai	Keletas klinikinių tyrimų su junginiais, tarp kurių OTX-015 (NCT01713582), CPI-0610 (NCT02158858), TEN-010 (NCT02308761), GSK525762 (NCT01943851)
Histonų lizino metiltransferazės	EZH2 MLL-kompleksai	EZH2 slopikliai DOT1L slopikliai MLL-Menino sąveikos slopikliai MLL-LEDGF sąveikos slopikliai	Ikiklinikiniai tyrimai Klinikiniai tyrimai junginių, tarp kurių ir EPZ-6576 (NCT01684150) Ikiklinikiniai tyrimai Ikiklinikiniai tyrimai
Histonų lizino demetilazės	LSD1 KDM Jumonji šeima	LSD1 slopikliai Mažos molekulinės masės slopikliai, konkuruojantys su 2-oksoglutaratu	Klinikiniai tyrimai junginių, tarp kurių ir GSK2879552 (NCT02177812) ir tranilkiprominas kombinacijoje su tretinoinu (NCT02261779). Ikiklinikiniai tyrimai
Histonų arginino metiltransferazės	PRMT	PRMT slopikliai	Ikiklinikiniai tyrimai

Tarp kitų epigenetiškai veikiančių junginių, potencialiai naudotinių ŪML gydymui, paminėtini ir HDAC slopikliai. Keletoje klinikinių tyrimų įvertintas HDAC slopiklių poveikis mielodisplaziniam sindromui ir ūminei mieloidinei leukemijai. Nors HDACi ir pasižymėjo antileukeminiu aktyvumu *in vivo*, tačiau naudojant šiuos junginius kaip monoterapiją gauti gan kuklūs rezultatai: po poveikių varinostatu teigiamas atsakas registruotas apytiksliai 17 %

pacientų (Garcia-Manero ir kt., 2008; Schaefer ir kt., 2009; Prebet ir Vey, 2011), MGCD0103115 – iki 13 % (Garcia-Manero ir kt., 2008). Kitų HDACi efektyvumas buvo dar mažesnis (Giles ir kt., 2006; Gojo ir kt., 2007; Morabito ir kt., 2016). Visgi parodyta, jog naudojant HDACi kombinacijoje su kitais epigenetiniais modulatoriais, pvz., DNMTi, galima pasiekti geresnių rezultatų (Gore ir kt., 2006; Soriano ir kt., 2007; Min ir kt., 2017). Be to, HDACi kombinacijoje su EZH2 ir LSD1 slopikliais taip pat pasižymėjo sinergetiniu, AML ląsteles žudančiu, aktyvumu (Fiskus ir kt., 2009; Fiskus ir kt., 2014). Reikėtų pasakyti, kad HDACi ir HMTi kombinacijų naudojimas ŪML terapijoje – racionalus pasirinkimas. Moksliniai tyrimai parodė, jog EZH2, padedamas kito PRC2 komplekso baltymo EED, sąveikauja su I klasės HDAC, būtent su HDAC1 ir HDAC2 (Varambally ir kt., 2002; Cao ir Zhang, 2004). Ši sąveika yra būtina EZH2 genų raišką slopinančiam aktyvumui pasiekti (Varambally ir kt., 2002; Nichol ir kt., 2016). Be to, yra žinoma, jog HDAC slopikliai taip pat geba susilpninti ir PRC2 baltymų raišką (Fiskus ir kt., 2006; Takashina ir kt., 2016). Aptarti duomenys leidžia daryti prielaidą, jog vienu kartu nuslopinus šiuos epigenetinius reguliatorius būtų galima pasiekti stipresnį antileukeminį efektą, kas ir parodyta naudojant EZH2 slopiklius ir HDACi panabinostatą (Fiskus ir kt., 2009).

Reikėtų pažymėti, jog epigenetinių moduliatorių slopikliai, naudojami kombinacijoje kartu su RA, sustiprina RA diferenciacinį veikimą. *In vivo* ir *in vitro* tyrimais parodyta, jog HDACi, esant RA atspariems ŪML atvejams, padidina kraujo ląstelių histonų acetilinimo laipsnį ir atstato jautrumą RA diferenciaciniam poveikiui (Kosugi ir kt., 2001; Savickiene ir kt., 2009), taip pat padidina ir RA jautrių ŪML ląstelių granulocitinę diferenciaciją (Merzvinškyte ir kt., 2006; Savickiene ir kt., 2006a; Savickiene ir kt., 2006b).

3. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

3.1. Medžiagos ir reagentai

Ląstelių kultivavimui naudotos medžiagos: Terpė *RPMI Medium 1640(IX)+GlutaMAXTM-1* (Gibco, JAV), penicilinas / streptomocinas 5000 U/ml (Gibco, JAV), fetalinis veršelio serumas (angl.: FCS; Life technologies, Jungtinė Karalystė).

Cheminiai junginiai, kuriais veiktos ląstelės: HDACi belinostatas (Bel, tirpinta DMSO; Selleck chemicals, JAV), HMTi 3-deazaneaplanocinas A (DZNep, tirpinta EtOH; Cayman Chemical, JAV), HMTi BIX-01294 (Bix, tirpinta EtOH; IBL Intern., Vokietija), retinoinė rūgštis (RA, tirpinta EtOH; Sigma, JAV).

Ląstelių skaičiavimui naudotos medžiagos: tripano mėlis (Pharmacia, Švedija), nitro tetrazolio mėlis (angl.: NBT; Sigma, JAV), forbol miristato acetatas (angl.: PMA; Sigma-Aldrich, JAV).

Tėkmės citometrijai naudotos medžiagos. Ląstelių ciklui įvertinti naudotas PBS (sudėtį žiūrėti poskyryje „Pagrindiniai naudoti buferiai”), 96 % etanolis (Vilniaus degtinė, Lietuva), propidžio jodidas (PJ; Sigma, JAV), RNazė A (Sigma-Aldrich, JAV). Tėkmės citometriniams paviršinių žymenų tyrimams naudoti antikūnai (iš BD Pharmingen, JAV): CD11b – monokloninis pelės prieš žmogaus CD11b (žymėtas su R-fikoeritrinu, FE; #555388), CD15 – monokloninis pelės prieš žmogaus (žymėtas su fluoresceino izotiocianatu, FITC, #332778), CD33 – monokloninis pelės prieš žmogaus (FITC; #340533), CD45 – monokloninis pelės prieš žmogaus (FITC, #555482). Neigiamai kontrolei naudotas specifiškas izotipui, FE konjuguotas, pelės IgG1 (sc-2866; Santa Cruz Biotechnology, Vokietija) ir pelės IgG1, konjuguotas FITC

(#11-4714-41; Invitrogen, JAV). Mėginių paruošimui naudotas paraformaldehidas (Sigma-Aldrich, JAV). Tėkmės citometriniams ląstelių apoptozės įvertinimui naudotas rinkinys *Apoptosis Assay Kit – FITC* (Exbio, Čekija).

RNR išskyrimui ir paruošimui tolimesniems tyrimams naudota: *TRIzol* reagentas (Invitrogen, ES), chloroformas (Applchem, Vokietija), izopropanolis (Sigma-Aldrich, JAV), etanolis (Vilniaus degtinė, Lietuva), kDNR sintezės rinkinys *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, ES).

kPGR reakcijoms naudota: *SYBR Green qPCR MM no ROX* ir vanduo be nukleazių (Thermo Scientific, ES) bei pradmenys iš Metabion International AG (Vokietija). Pradmenų sąrašas pateiktas 3.4. skyriuje, poskyriuose „Genų raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu“ bei „Tirpaus chromatino imunoišsodinimas (ChIP) ir paruošimas kPGR“.

Tirpaus chromatino išskyrimui ir imunoišsodinimui naudotos medžiagos: DOC (Amresco, JAV), EDTA (Amresco, JAV), EGTA (Amresco, JAV), glicinas (PlusOne, Švedija), HEPES (Sigma-Aldrich, JAV), ličio chloridas (Sigma-Aldrich, JAV), natrio chloridas (Amresco, JAV), natrio butiratas (Sigma-Aldrich, JAV), natrio fluoridas (Sigma-Aldrich, JAV), natrio vanadatas (Sigma-Aldrich, JAV), SDS (Carl Roth, Vokietija), NP-40 (Amresco, JAV), PMSF (Sigma-Aldrich, JAV), proteazių slopiklių kokteilis, 100-kartinis (Roche, Vokietija), proteinazė K (Sigma-Aldrich, JAV), RNazė A (Sigma-Aldrich, JAV), Tris (PlusOne, Švedija), Triton X-100 (Serva, Vokietija), β-glicerofosfatas (Sigma-Aldrich, JAV), *Centriplus YM-50* (Amicon, Vokietija) kolonėlės, agarozės A/G kompleksas (GE Healthcare Life Sciences, JAV), antikūnas prieš hiperacetilintą hitoną H4 (Millipore, JAV). DNR fragmentų valymui naudotos *QIAquick PCR kolonėlės* (Qiagen, JAV).

Priemonės DNR elektroforezei: agarozė (Invitrogen, JAV), 1-kartinis TAE buferis (sudėtis nurodyta 3.2. poskyryje „Pagrindiniai naudoti buferiai”), *Midori Green DIRECT DNA stain* (NIPPON Genetics, Vokietija), *O’GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus* (Thermo Scientific, ES), *Fast Ruler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific, ES).

Baltymų išskirimui naudotos medžiagos: benzonazė (Novagen, Vokietija), SDS mėginio buferis (sudėtis nurodyta 3.1. poskyryje „Pagrindiniai naudoti buferiai”).

Baltymų elektroforezei naudota: 40 % akrilamido / bisakrilamido tirpalas (Carl-Roth, Vokietija), amonio persulfatas (Sigma-Aldrich, JAV), TEMED (Reneal, Vengrija), glicerolis (Serva, JAV), Tris (PlusOne, Švedija), glicinas (PlusOne, Švedija), SDS (Carl Roth, Vokietija), *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific, ES), *Brilliant Blue G*-koloidinis (Sigma, JAV).

Baltymų imuninei analizei naudotos medžiagos: PVDF membranos (Millipore, JAV), Tween-20 (Amresco, JAV), nuriebalinto pieno milteliai (Sigma-Aldrich, JAV), ECL mišinys (GE Healthcare, JAV), rentgeno juosta *Hyperfilm ECL* (Amersham Pharmacia Biotech, JAV). Baltymų imuninei analizei naudoti pirminiai antikūnai: monokloniniai prieš GAPDH (ab8245) ir prieš PCAF (#12188) (Abcam, Jungtinė Karalystė), polikloniniai prieš EZH2 (#4905), SUZ12 (#3737), HDAC-1 (#6062), HDAC-2 (#9928) (Cell signalling, JAV), monokloninis prieš surviviną (sc-37616), polikloniniai prieš p27 (sc-527) ir PARP-1 (sc-8007), DNMT1 (sc-10222) (Santa Cruz Biotechnology, Vokietija), prieš acetilintą H4K16 (#07-329), prieš di- (#07-441) ir trimetilintą (#07-442) H3K9 (Upstate Biotechnology, JAV). Taip pat polikloniniai prieš trimetilintą H3K27 (#07-449), prieš trimetilintą H3K4 (#05-745R) ir prieš hiperacetilintą (penta) histoną H4 (#06-946), monokloniniai prieš cikliną E1

(#04-222) ir kaspazę-3 (#06-735) (Millipore, JAV), polikloninis antikūnas prieš WT-1 baltymą (PA5-18548) ir monokloninis antikūnas prieš EED baltymą (MA5-16314) įsigyti iš Thermo Fisher Scientific (ES). HRP konjuguoti antriniai antikūnai įsigyti iš Dako Cytomation (JAV; #2021-64, #2020-12, #2020-14).

HDAC ir HMT aktyvumui nustatyti naudotos medžiagos: *NuEz* tirpalas, rinkiniai *EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit* ir *EpiQuik Histone Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit (H3K27)* (EpiGentek, JAV).

Pagrindiniai naudoti buferiai:

- 1-kartinis Baltymų elektroforezės buferis, pH = 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS).
- 1-kartinis PBS buferis, pH = 7,3 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄).
- 1-kartinis TAE buferis, pH = 8,0 (40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA).
- 4-kartinis Tris-HCl/SDS, pH = 6,8 (0,5 M Tris, 0,4 % SDS, HCl).
- 4-kartinis Tris-HCl/SDS, pH = 8,8 (1,5 M Tris, 0,4 % SDS, HCl).

3.2. Prietaisai

Automatinės prisiurbimo kriaušės *Easypet* (Eppendorf, Vokietija), baltymų elektroforezės aparatas *Mighty Small SE250/SE260* (Hofer Inc., JAV), baltymų pernešimo sistema *OmniPAGE Blot Mini* (Clever Scientific LTD, Jungtinė Karalystė), centrifugos *Eppendorf* (modeliai: 5430 R ir 5804 R, Vokietija), DNR bei baltymų detektavimo ir gelių dokumentavimo sistema *ChemiDoc MP* (Bio Rad, Italija), DNR elektroforezės aparatas *Minnie Gel Unit* (Amersham Biosciences, Jungtinė Karalystė), gradientatorius *Gradient Maker* (Pharmacia LKB, Švedija), hematologinis analizatorius *Exigo EOS* (Boule Medical AB, Švedija), kaitinimo blokas *Accu BlockTM* (Labnet, JAV),

keičiamo tūrio pipetės *Eppendorf* (1000, 200, 10, 2, 1 µl; Vokietija), kPGR aparatas *Rotor-Gene 6000* (Rcorbett Research, Australija), laminarinė traukos spinta *Biovisard Golden line* (Kojair, Suomija), ląstelių termostatas *CB 150* (Binder, Vokietija), peristaltinis siurblys *MP II* (Harvard Apparatus, JAV), PGR aparatas *Arktik Thermal Cyclor* (ThermoFisher Scientific, ES), pH-metras *MP-220* (METTLER TOLEDO, Šveicarija), purtyklė *Vortex Mixer* (Labnet, JAV), purtyklė / inkubatorius *Vortemp 56* (Labnet, JAV), siūbuojanti platforma *Rocker 25* (Labnet, JAV), sonikavimo sistema *Bioruptor Pico* (Diagenode, Belgija), spektrofotometras *NanoPhotometer* (IMPLEN, JAV), srovės šaltinis *Power Station 300 Plus* (Labnet, JAV), šaldymo sistema *Minichiller* (Huber, Vokietija), šviesinis mikroskopas *PZO* (Warszawa, Lenkija), tėkmės citometras *BD FACSCanto II* (BD FACSDiva programinė įranga; Beckton and Dickinson, Jungtinė Karalystė), vakuuminis siurblys *Laboport* (KNF, JAV).

3.3. Tyrimo objektas

3.3.1. HL-60 ląstelės

HL-60 – žmogaus ūminės mieloidinės leukemijos ląstelės (PAB M2), įsigytos iš ląstelių banko DSMZ. Šioms ląstelėms būdinga c-myc geno amplifikacija (15–30 kartų) (Yen, 1989). HL-60 ląstelės išsiskiria ir tuo, jog jose nevyksta p53 geno raiška ir jų N-ras onkogeno 61-ajame kodone aptinkama taškinė mutacija (Collins ir kt., 1987). HL-60 ląstelių spontaninę diferenciaciją į subrendusius granulocitus galima indukuoti dimetilsulfoksidu (DMSO), aktinomicinu-D arba retinoine rūgštimi, o 1,25-dihidroksi vitaminas D₃, forbol esteriai ir natrio butiratas indukuoja diferenciaciją monocitine / makrofagine kryptimi (Collins ir kt, 1987).

3.3.2. NB4 ląstelės

Ląstelių linija įsigyta iš ląstelių banko DSMZ. NB4 ląstelės – žmogaus ŪPL (PAB M3) ląstelių linija, pasižyminti t(15;17) chromosomine

translokacija. Šios ląstelės dažnai naudojamos kaip modelis atsako į RA tyrimams. Parodyta, jog RA indukuoja NB4 ląstelių diferenciaciją į normalius granulocitus, su jiems būdingu specifiniu fenotipu (CD11b, CD11c, CD13 ir CD33) (Zang ir kt., 2000). Šiuo atveju svarbų vaidmenį leukemogenezės procese vaidina dėl translokacijos atsiradęs sulietinis baltymas PML-RAR α – pastarasis blokuoja promielocitinių ląstelių diferenciaciją ir didina šių ląstelių išgyvenamumą (Grignani ir kt., 1998).

3.3.3. Imunodeficitinės NOG pelės

Vyriškos lyties 9–12 sav. amžiaus imunodeficitinės NOG pelės įsigytos iš Taconic (Danija). Gyvūnai auginami VU Biochemijos instituto vivariume specialiomis sąlygomis (apsaugota nuo patogenų).

Imunodeficitinės NOG pelės neturi subrendusių T, B ir NK ląstelių. Taip pat pasižymi sumažėjusiu komplemento sistemos aktyvumu, sutrikęs šių pelių ir makrofagų bei dendritinių ląstelių funkcionavimas. Pažymėtina, jog imunodeficitinėms NOG pelėms, skirtingai nei NOD scid pelėms, labai retai išsivysto limfoma. Dėl šių priežasčių imunodeficitinės NOG pelės naudojamos kaip modelis vėžio, infekcinių ligų, imunologijos bei regeneracinės medicinos tyrimuose (pagal www.taconic.com).

3.4. Metodai

3.4.1. Ląstelių kultivavimas

NB4 ir HL-60 ląstelės kultivuotos RPMI-1640 terpėje su 10 % fetalinio veršiuko serumo bei antibiotikais (100 vnt./ml penicilino ir 100 μ g/ml streptomicino) termostate (esant +37 °C temperatūrai ir 5 % CO₂ koncentracijai). Ląstelių tankis palaikytas nuo $5 \cdot 10^5$ ląst./ml iki $1\text{--}1,2 \cdot 10^6$ ląst./ml. Bandydams ląstelės išsėtos $5 \cdot 10^5$ ląst./ml tankiu. Į ląstelių suspensiją pridėti tirti HDAC ir HMT slopikliai bei diferenciacijos induktorius RA. Tyrimų metu buvo naudotas histonų deacetilazių slopiklis belinostatas,

histonų metiltransferazių slopikliai BIX-01294 ir 3-deazaneplanocinas A. Ląstelės veiktos vienu BIX-01294 (2–5 μM) bei 2 μM BIX-01294 kartu su 1 μM RA. Taip pat NB4 ir HL-60 ląstelės veiktos 0,5 μM DZNep, atskirai ar kartu su 1 μM RA. Vienu belinostatu veikta naudojant 0,2–2 μM koncentracijas. Taip pat belinostatu veikta kartu su RA (0,2 μM Bel + 1 μM RA) bei triguba kombinacija kartu su DZNep ir RA (kai visais trimis junginiais paveikta iš karto: 0,2 μM Bel + 0,5 μM DZNep + 1 μM RA; arba kai 4 val. ląstelės veiktos belinostatu kartu su DZNep, po to pašalinta terpė, ląstelės nuplautos ir toliau kultivuotos šviežioje terpėje tik su RA: 0,2 μM Bel + 0,5 μM DZNep (4 val.) \rightarrow 1 μM RA). Tyrimų metu paveiktos ląstelės kultivuotos nurodytą laiką (6–96 val.).

3.4.2. Ląstelių augimo ir gyvybingumo įvertinimas

Ląstelių augimas ir gyvybingumas buvo nustatomas dažant ląsteles tripano mėliu (0,2 %). Dažymui ląstelių suspensija ir tripano mėlis maišyti santykiu 1:1. Ląstelės skaičiuotos hematocitometru naudojant šviesinį mikroskopą. 0,2 % tripano mėlis žuvusias ląsteles nudažo mėlynai. Ląstelių augimas išreikštas gyvų ląstelių kiekiu $\cdot 10^4$ ląst./ml, gyvybingumas – procentine gyvų ląstelių dalimi nuo bendro ląstelių skaičiaus.

3.4.3. Ląstelių diferenciacijos įvertinimas

Yra žinoma, jog diferencijuoti granulocitai gamina superoksido anijoną ir todėl subrendusios ląstelės yra nustatomos pagal pastarųjų gebėjimą redukuoti geltonos spalvos nitro tetrazolio mėlį (angl.: NBT) į netirpų juodai mėlyną formazaną po stimuliacijos su forbol miristato acetatu (angl.: PMA). Tyrimų metu 100 μl ląstelių suspensijos sumaišyta su 100 μl 0,2 % NBT (PBS tirpale), pridėta PMA tirpalo iki 200 ng/ml ir inkubuota 30 min. esant +37 $^{\circ}\text{C}$ temperatūrai. Diferencijuotos (NBT teigiamos ląstelės) skaičiuotos su

hemocitometru naudojant šviesinį mikroskopą. Diferencijuotų ląstelių skaičius išreikštas procentu nuo gyvų ląstelių skaičiaus.

Ląstelių granulocitinė diferenciacija taip pat įvertinta atlikus tėkmės citometrinę paviršinio ląstelių žymens CD11b analizę. Kiekvienam mėginiui imta po pusę milijono ląstelių. Ląstelės du kartus nuplautos PBS, pridėta FE-konjuguoto CD11b antikūno ir tuomet mėginiai 30 min. +4 °C inkubuoti tamsoje. Po to ląstelės vėl nuplautos su PBS ir užfiksuotos 2 % paraformaldehido PBS buferyje (fiksacijos metu mėginiai laikyti lede). Prieš tėkmės citometrinę analizę ląstelės vėl suspenduotos PBS buferyje. Kiekvienam mėginiui registruota 10 000 įvykių. Nespecifinis antikūno prisijungimas įvertintas naudojant pelės FE-konjuguotą IgG1. Nespecifiškam fluorescencijos signalui atmesti panaudotos kontrolinės ląstelės, kurios buvo neinkubuotos su CD11b antikūnu.

3.4.4. Ląstelių ciklo analizė

3 milijonai kontrolinių (neveiktų) bei cheminiais junginiais ar jų kombinacijomis paveiktų ląstelių surinktos centrifuguojant 5 min. 200 g esant +4 °C. Ląstelės du kartus plautos 4 ml PBS, galiausiai suspenduotos 1 ml šalto PBS. Į 15 ml polipropileno mėgintuvėliuose esančias ląstelių suspensijas lašinant pridėta po 3,3 ml šalto 96 % etanolio (galutinė koncentracija – 75 %). Švelniai išmaišyta, kad nesusidarytų agregatų. Ląstelės per naktį fiksuotos etanolyje –20 °C. Vėliau etanolis pašalintas centrifuguojant 10 min. 200 g esant +4 °C. Ląstelės du kartus plautos 4 ml PBS, po to suspenduotos 500 µl PBS su PJ (50 µg/ml) ir RNaze A (50 µg/ml). Tirpalas paruoštas į 500 µl PBS pridėjus 25 µl PJ (iš 1 mg/ml) ir 2,5 µl RNazės A (iš 10 mg/ml). Inkubuota 30 min. esant +37 °C. Mėginiai laikyti tamsoje. Praėjus inkubaciniam laikui, ląstelės analizuotos tėkmės citometru.

3.4.5. Apoptozės nustatymas tėkmės citometrijos metodu

Tėkmės citometriniams apoptozės įvertinimui naudotas *Apoptosis Assay Kit* – FITC (Exbio, Čekija) rinkinys. Vadovautasi gamintojo instrukcijomis.

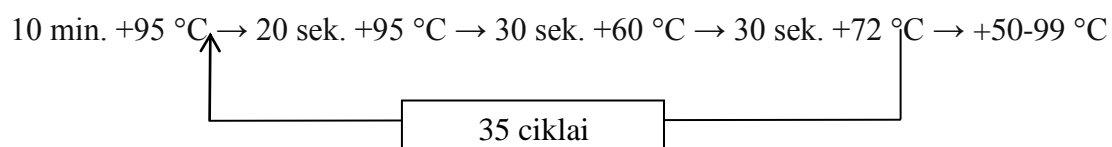
3.4.6. RNR išskyrimas ir kDNR sintezė

3 milijonai kontrolinių (neveiktų) bei cheminiais junginiais ar jų kombinacijomis paveiktų NB4 ir HL-60 ląstelių buvo nucentrifuguotos 10 min. 500 g. Pašalinus terpę, ląstelių nuosėdos užpildtos 800 μ l *TRIzol* tirpalo. Švelniai išpipetavus, lizatai perkelti į 1,5 ml mėgintuvėlius, inkubuota 5 min. esant +24 °C. Prabėgus inkubaciniam laikui, į mėgintuvėlius pripilta po 213 μ l chloroformo, tuomet mėgintuvėliai 15 s atsargiai papurtyti ir 10 min. inkubuoti kambario temperatūroje. Po to mėginiai 15 min. centrifuguoti 12 000 g esant +4 °C. 200 μ l viršutinės fazės, kurioje ir atsiskyrė RNR, nusiurbta ir perkelta į naują mėgintuvėlį be RNazių. RNR išsodinimui panaudota po 533 μ l izopropanolio kiekvienam mėginiui. Mėgintuvėliai supurtyti ir inkubuoti 10 min. +24 °C temperatūroje. Vėliau vėl 10 min. nucentrifuguoti 12 000 g esant +4 °C. Vizualiai įvertinus RNR nuosėdų susidarymą, viršutinė frakcija pašalinta, o RNR nuosėdos praplautos su 1 ml 75 % etanolio. Centrifuguota 7 500 g, 5 min., +4 °C. Nusiurbus etanolio likučius, RNR nuosėdos išdžiovintos. Po to RNR ištirpdyta vandenyje be nukleazių. RNR koncentracija ir RNR švarumas įvertinti *Implen NanoPhotometer* spektrofotometru ($A_{260}/A_{280} \sim 1,8$, o $A_{260}/A_{230} \sim 1,8-2$). kDNR sintezei imta po 2 μ g RNR. Reakcijai naudotas *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit* rinkinys, sintezė vykdyta termocikleryje *Arktik ThermalCycler*. Kiekvienai reakcijai imta po 4 μ l 5-kartinio buferio, 2 μ l atvirkštinės transkriptazės, 2 μ g RNR ir vandens iki 20 μ l bendro tūrio. Taip pat paruoštos –AT kontrolės (į reakcijos mišinį nedėta fermento atvirkštinės transkriptazės, sintetinančio kDNR grandinę nuo RNR matricos).

3.4.7. Genų raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu

Pagamintas bendras reakcijos mišinys, sudarytas iš specifinių pradmenų (lentelė 3.5.10.1.), vandens be nukleazių ir reakcijos buferio *SYBR Green qPCR MM no ROX*. Bendras reakcijos mišinys išpilstytas į mėgintuvėlius po 8 μ l. Tiriamieji mėginiai paruošti įpilant 2 μ l 10 kartų skiestos kDNR, o kontroliniai – 2 μ l vandens be nukleazių. Kiekybiniam genų raiškos įvertinimui

naudotas *Corbett Rotor Gene 6000* aparatas ir jo programinė įranga. Žemiau nurodytos reakcijos atlikimo sąlygos:



AT-kPGR reakcijos rezultatai įvertinti naudojant santykinę $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodą. Remiantis šiuo metodu, palyginta genų raiška ląstelėse po poveikio ir kontrolinėse (neveiktose) ląstelėse.

3.4.7.1 lentelė. Genų raiškos tyrimams naudoti pradmenys.

Genas (1)	Pradmenys (2)
<i>ATG5</i>	5' CTTTGCATCACCTCTGCTTTC 3' 5' TAGGCCAAAGGTTTCAGCTTC 3'
<i>BECN1</i>	5' CTCCCGAGGTGAAGAGCATC 3' 5' GCTGTTGGCACTTTCTGTGG 3'
<i>CEBPA</i>	5' GCTCGCCATGCCGGGAGAACT 3' 5' TGCAGGTGGCTGCTCATCGG 3'
<i>CEBPE</i>	5' CAGCCGAGGCAGCTACAATC 3' 5' AGCCGGTACTCAAGGCTATCT 3'
<i>EED</i>	5' GTGACGAGAACAGCAATC 3' 5' TATCAGGGCGTTCAGTGTTT 3'
<i>EZH2</i>	5' GTGGAGAGATTATTTCTCAAGATG 3' 5' CCGACATACTTCAGGGCATCAGCC 3'
<i>EHMT2</i>	5' CTCCGCTGATTTTCGAGTGTA 3' 5' GTCGAAGAGGTAAGAATCATCC 3'
<i>GAPDH</i>	5' AACTCTGGTAAAGTGGATATTG 3' 5' GGTGGAATCATATTGGAACA 3'
<i>CSF3</i>	5' GCTGCTTGAGCCAACTCCATA 3' 5' GAACGCGGTACGACACCTC 3'
<i>CSFR</i>	5' CTTGTGGCCTATAACTCAGCC 3' 5' CCCACTCAATCACATAGCCCT 3'
<i>HDAC1</i>	5' CAAGCTCCACATCAGTCCTCCC 3' 5' TGCGGCAGCATTCTAAGGTT 3'
<i>HDAC2</i>	5' AGTCAAGGAGGCGGCAAAA 3' 5' TGCGGATTCTATGAGGCTTCA 3'
<i>CDKN1B</i>	5' TAATTGGGGCTCCGGCTAACT 3' 5' TGCAGGTCGCTTCCTTATTCC 3'
<i>PCAF</i>	5' GGCCGAGGAGTCTTGTAAT 3' 5' AGTGAAGACCGAGCGAAGCA 3'

(1)	(2)
<i>PML-RARA</i>	5' CAGTGTACGCCTTCTCCATCA 3' 5' GCTTGTAGATGCGGGGTAGA 3'
<i>PPARG</i>	5' GCTCTAGAATGACCATGGTTGAC 3' 5' ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC 3'
<i>SUZ12</i>	5' AGGCTGACCACGAGCTTTTC 3' 5' GGTGCTATGAGATTCCGAGTTC 3'
<i>WT1</i>	5' GGCATCTGAGACCAGTGAGAA 3' 5' GAGAGTCAGACTTGAAAGCAGT 3'

3.4.8. Tirpaus chromatino išskyrimas sonikuojant

Hiperacetilinto histono H4 sąrišos su *CEBPA*, *CEBPE* ir *PPARG* promotorinėmis sekomis tyrimo metu tirpus chromatinas išskirtas iš $2 \cdot 10^7$ NB4 ir HL-60 ląstelių. Baltymų kompleksų, sąveikaujančių su hiperacetilintu histonu H4, įvertinimui panaudota $6 \cdot 10^7$ NB4 ląstelių.

Tirpaus chromatino išskyrimas sonikuojant atliktas kaip aprašyta straipsnyje Valiuliene ir kt. (2015). Sonikuota ultragarsiniu dezintegratoriumi *Bioruptor Pico*. Sonikuota esant +4 °C. Atrinktos optimaliausios NB4 ir HL-60 ląstelių sonikavimo sąlygos: NB4 ląstelių chromatino suskaldymui naudota 20 sonikavimo ciklų, o HL-60 – 25 ciklai. Po sonikavimo mėginiai 30 min. maišyti kambario temperatūroje. Neištirpusi frakcija nusodinta centrifuguojant 10 min. 16 000 g esant +20 °C. Tirpi viršutinė frakcija surinkta. Dalis (50 µl) gauto tirpaus chromatino naudota DNR išskyrimui (*Input* frakcija) ir DNR fragmentų dydžio įvertinimui.

3.4.9. DNR išsodinimas ir DNR fragmentų analizė

50 µl tirpaus chromatino atskiesta 300 µl TE buferio (10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 1 mM EDTA). Mėginiai per naktį laikyti +65 °C, po to įpilta 10 µg RNazės A ir inkubuota 1 valandą esant +37 °C. Vėliau įpilta EDTA iki 5 mM, SDS iki 0,25 %, 25 µg Proteinazės K ir 2 valandas inkubuota +45 °C temperatūroje. Į apvalytą tirpų chromatiną įpiltas toks pat tūris fenolo / chloroformo / izoamilio alkoholio mišinio, mėginiai purtyti 1 min. Tuomet fazės atskirtos 10 min. centrifuguojant 16 000 g kambario temperatūroje. Viršutinė frakcija atsargiai surinkta ir perpilta į naują

mėgintuvėlių. 12 µl viršutinės skaidrios frakcijos panaudota DNR fragmentų analizei, o likusi dalis – tolimesniam DNR nusodinimui.

DNR nusodinta į mėgintuvėlių įpylus 1/10 tūrio 3 M natrio acetato (pH = 5). Mišinys išmaišytas ir atšaldytas lede. Į mišinį įpilta 2 ir 1/2 tūrio šalto –20 °C 96 % etanolio. DNR per naktį nusodinta –20 °C temperatūroje. Vėliau DNR surinkta centrifuguojant 20 min. 19 300 g esant +4 °C. Viršutinė frakcija nupilta ir nusėdusi DNR tris kartus praplauta 1 ml šalto etanolio. Etanolis nusiurbtas ir nuplauta DNR pradžiovinta kambario temperatūroje. Po to DNR ištirpinta TE buferyje (10 mM Tris-HCl, pH = 7,4, 0,1 mM EDTA). Pamatavus DNR koncentraciją, ši DNR toliau naudota kaip *Input* kontrolė.

Siekiant patikrinti DNR fragmentų dydį buvo atlikta DNR elektroforezė (atlikta horizontaliame 1,8 % agarozės gelyje naudojant 1-kartinį TAE buferį). Prieš elektroforezę į kiekvieną mėginį įnešta DNR interkaliuojančio dažo *Midori Green DIRECT DNA stain* ir gerai išmaišyta. Elektroforezė vykdyta esant 80 V įtampai. Frakcionuota ~ 90 min. Po elektroforezės gelis fotografuotas *ChemiDoc MP* sistema.

3.4.10. Tirpus chromatinas imunoišsodinimas ir paruošimas kPGR

Tirpus chromatinas praskiestas buferiu (10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, proteazių slopinkliai) tokiu tūriu, kad SDS prasiskiestų iki 0,1 %. Praskiestas tirpus chromatinas toliau buvo koncentruotas su *Centriplus YM-50* kolonėle iki pradinio tūrio (centrifuguota 30–45 min. 2000 g esant +15 °C). Su 20-kartiniu buferiu, pritaikytu prie RIPA (10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 800 mM NaCl, 20 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 2 % DOC, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA), buvo pristatyta iki sąlygų, tinkamų imunoišsodinimui.

Į 500 µl praskiesto tirpus chromatinas pridėta 5 µl antikūno prieš hiperacetilintą histoną H4, inkubuota per naktį –4 °C. Po to į mišinį pridėta 25 µl agarozės A/G ir maišyta 2 val. –4 °C. Nuosėdos surinktos centrifuguojant 3 min. 980 g esant –4 °C. Nuosėdos du kartus plautos su RIPA buferiu (10 mM Tris-HCl, pH = 8, 140 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 2 % DOC,

1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA), kaskart surinktos centrifuguojant po 3 min. 980 g esant –4 °C. Vėliau mėginiai du kartus plauti RIPA buferiu su 500 mM NaCl. Po to dar du kartus plauta ličio buferiu (10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 0,25 M LiCl, 1 % NP-40, 1 % DOC, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA), taip pat 2 kartus su TE buferiu (10 mM Tris-HCl pH = 8,0, 1 mM EDTA) centrifuguojant po 3 min. 980 g esant +4 °C. Ant nusėdusio A/G agarozės–baltymo komplekso užpilta 100 µl TE buferio ir palikta +65 °C per naktį. Kitą dieną į mišinį įpilta 1 µl 10 mg/ml RNAzės A, išmaišyta ir 1 val. inkubuota +37 °C. Po inkubacijos į mėgintuvėlį įpilta 0,98 µl 0,5 M EDTA, 1,58 µl 20 % SDS, 2 µl 10 mg/ml Proteinazės K. Mėginiai 3–5 val. inkubuoti +45 °C. A/G agarozės–DNR kompleksas 100 µl TE buferyje valytas *QIAquick PCR* kolonėlėmis. DNR surišimui naudotas PBI buferis. Buferio bei agarozės ir DNR komplekso TE buferyje mišinys centrifuguotas 1 min., nuplautas su 750 µl PE buferio ir sukonzentruotas 30 µl EB buferio mėgintuvėliuose be RNAazių.

kPGR reakcijai imta 2 µl 10 kartų skiestos DNR eliacijos. Visos kitos procedūros – tokios pačios kaip ir aprašytos 3.4.7. skyriuje „Genų raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu“. kPGR eiga analogiška nurodytajai. Naudoti pradmenys pateikti 3.4.10.1 lentelėje.

3.4.10.1 lentelė. *ChIP* tyrimams naudoti pradmenys.

Genas	Pradmenys
<i>CEBPA</i>	5' GTGCAGCCTCGGGATACTC 3' 5' CTCCTCCTGCCTGCCCTA 3'
<i>CEBPE</i>	5' GCTAACCGGAATATGCTAATCAG 3' 5' CCTTTCAGAGACACCTGCTC 3'
<i>PPARG</i>	5' CAGCACCACCGATCAGAAGA 3' 5' TCCCATTTCGAGGAGGGAT 3'

ChIP tyrimų kPGR rezultatai apskaičiuoti % *Input* metodu. Kiekviena *ChIP* DNR frakcijos Ct vertė buvo normalizuota atsižvelgiant į *Input* DNR frakcijos Ct vertę:

$\Delta Ct[\text{normalizuota}] = (Ct(\text{ChIP}) - (Ct(\text{Input}) - \text{Log}_2(\text{Input praskiedimo veiksnys})))$.

Kiekvienai ChIP frakcijai apskaičiuotas % *Input*:

$$\% \text{ Input} = 2^{(-\Delta Ct[\text{normalizuota}])}$$

3.4.11. Tirpaus chromatino imunoišsodinimas MS tyrimui

Visos ChIP procedūros atliktos taip, kaip aptarta ankstesniuose skyriuose. Baltymo A/G-agarozės–antikūno–baltymo kompleksas denatūruotas 7 M urėjos, 2 M tiourėjos, 40 mM DTT tirpale. Mėginiai pusę valandos purtyti purtyklėje (500 aps. / min.) esant +20 °C temperatūrai. Vėliau baltymų kompleksai +20 °C temperatūroje 7 min. centrifuguoti 166 g. Skyrimas pakartotas dar tris kartus. Visos keturios ekstrakcijos apjungtos ir naudotos tolimesniam masių spektrometrijos tyrimui.

3.4.12. MS tyrimas ir duomenų analizė

Išskirti baltymai koncentruoti 0,5 ml 30 kDa centrifuginiuose filtruose. Tripsinizavimo etapas atliktas pagal Wisniewski ir kt. (2009) aprašytą protokolą. Tripsinizuoti peptidai atskirti skysčių chromatografijos metodu ir toliau naudoti masių spektrometrinei analizei, kaip aprašyta publikacijoje Simoliūnas ir kt. (2013).

Pirminiai duomenys buvo apdoroti naudojant programą *ProteinLynx Global SERVER* (PLGS) (versija 2.5.2). Duomenų analizė atlikta, kaip nurodyta anksčiau (Valiulienė ir kt., 2015). Baltymų tarpusavio sąveikos funkciniai tinklai nubrėžti naudojant *STRING* duomenų bazę (string-db.org/).

3.4.13. Bendro baltymo išskyrimas

Ląstelių lizatai iš kontrolinių ir paveiktų ląstelių ($1,5\text{--}3 \cdot 10^6$) paruošti 6 min. nucentrifugavus ląstelių suspensiją 120 g esant +4 °C. Nusėdusios ląstelės suspenduotos PBS buferyje ir nusodintos centrifuguojant 5 min. 120 g esant +4 °C. Procedūra pakartota dar 2 kartus. Vienam tūriui nusodintų ląstelių

įpilta 1/10 tūrio benzonazės ir mėginiai 30 min. inkubuoti lede. Vėliau ląstelės lizuotos 2-kartiniame SDS mėginio buferyje (4 % SDS, 20 % glicerolio, 0,12 M Tris-HCl pH = 6,8 ir 10 % bromfenolio mėlio). Homogenizuotas mėginys inkubuotas 5 min. +96 °C temperatūroje, nucentrifuguotas ir saugotas tolimesniems tyrimams –20 °C šaldiklyje.

3.4.14. Baltymų frakcionavimas elektroforeze

Baltymai frakcionuoti 7,5–15 % gradientiniame poliakrilamido gelyje. Gelių polimerinimui naudota po 15 ml „lengvojo“ (7,5 % AA/bisAA, 375 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 0,1 % SDS) bei „sunkiojo“ (15 % AA/bisAA, 375 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 0,1 % SDS, 30 % glicerolio) tirpalų. Prieš supilant į gradientorių į šiuos tirpalus dar pridėta polimerizacijos iniciatorius 10 % amonio persulfato (50 µl) ir TEMED (10 µl). Geliams susipolimerinus, paruoštas ir supolimerintas koncentruojamasis gelis (30 % AA/0,8 % bisAA, 4-kartinis Tris-HCl (pH = 6,8), H₂O, 10 % amoniopersulfatas, TEMED). Elektroforezei naudotas Tris-glicino elektroforezės buferis (25 mM Tris-HCl (pH = 8,3), 192 mM glicino, 0,1 % SDS). Po elektroforezės vykdytas pernešimas arba daryta bendroji baltymų analizė (gelis dažytas *PageBlue*TM baltymų dažymo tirpalu).

3.4.15. Baltymų imuninė analizė

Po elektroforezės išfrakcionuoti baltymai pernešti ant PVDF membranos, kuri prieš tai buvo blokuota PBS tirpale su 5 % nuriebalinto pieno milteliais (1 val. inkubuota kambario temperatūroje). Membrana, nuplauta su PBS-0,05 % Tween, toliau inkubuota su pirminiais antikūnais PBS–pieno miltelių tirpale per naktį esant +4 °C. Vėliau membrana 3 kartus po 10 min. praplauta su vandeniu, po to 1 val. kambario temperatūroje inkubuota su krienų peroksidaze (HRP) konjuguotais atitinkamais antriniais antikūnais PBS-Tween 0,05 %-pieno miltelių tirpale (antikūnų skiedimai ruošti, kaip nurodyta gamintojo instrukcijoje). Po inkubacijos membrana 3 kartus po 10 min. praplauta su vandeniu, o po to dar 2 kartus su PBS-Tween.

Darbe naudoti pirminiai antikūnai nurodyti 3.1. skyriaus dalyje „Baltymų imuninei analizei naudotos medžiagos”. Antrinis antikūnas, konjuguotas su krieno peroksidaze, skiestas 0,05 % PBS-Tween tirpalu su 2 % nuriebalinto pieno (skiedimai ruošti, kaip nurodyta gamintojo instrukcijose). Membrana su antriniu antikūnu inkubuota kambario temperatūroje 1 val. Po to membrana praplauta distiliuotu vandeniu ir 7 kartus po 5 min. praplauta su 0,1 % PBS-Tween tirpalu bei dar 2 kartus su distiliuotu vandeniu. Baltymams aptikti naudota rentgeno juosta ir ECL reagentai. Aptikti baltymai nuskenuoti (su *GE ImageScanner III*) ir kiekvienai kategorijai, po reikšmių suvienodinimo pagal GAPDH, kontrolės atžvilgiu apskaičiuotos santykinės reikšmės.

3.4.16. HDAC ir HMT aktyvumo nustatymas

Branduolių baltymai išskirti iš kontrolinių NB4 ląstelių ir ląstelių 24 ir 72 val. veiktų su 1 μ M RA, 0,5 μ M DZNep, 0,2 μ M Bel bei 0,5 μ M DZNep + 0,2 μ M Bel + 1 μ M RA. Ląstelės 6 min. centrifuguotos 100 g, du kartus nuplautos PBS. Branduoliai išskirti *NuEz* tirpalu, į kurį buvo įdėta PMSF (iki 1 mM) ir proteazių slopiklių kokteilio. Mėginiai 10 s papurtyti ir 5 min. laikyti lede, po to 5 min. nusukti centrifugoje 500 g. Išskirti branduoliai plauti buferiu su sacharoze (10 mM Tris-HCl, pH = 7,4, 0,3 M sacharozės, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM PMSF ir proteazių slopiklių kokteilio). Vėliau branduoliai dar kartą plauti buferiu be sacharozės (10 mM Tris-HCl, pH = 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF ir proteazių slopiklių kokteilio). Po to branduoliai lizuoti lizės tirpale (400 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH = 8,0, 200 μ M EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, proteazių slopiklių kokteilio, 3 mM DTT). Mėginiai 30 min. laikyti lede, po to 20 min. nucentrifuguoti 31 880 g. Išskirti nukleoplazmos baltymai naudoti HDAC ir HMT aktyvumų nustatymui su *EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit* ir *EpiQuik Histone Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit (H3K27)* rinkiniais, vadovaujantis gamintojo nurodymais.

3.4.17. *In vivo* tyrimai

In vivo tyrimai atlikti laikantis Lietuvos Respublikos Gyvūnų globos, laikymo ir naudojimo įstatymo (1997 m., Nr. VIII-500). Leidimą atlikti biomedicininį tyrimą, naudojant laboratorinius gyvūnus, išdavė Lietuvos Respublikos valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba (Nr. 3; 2013-11-13).

3.4.17.1. *Ksenograftinių ŪPL pelių gavimas ir vėžinių ląstelių infiltracijos įvertinimas*

Šešioms NOG pelėms *i. v.* (į veną; angl.: *intravenous*) suleista $5 \cdot 10^6$ NB4 ląstelių, suspenduotų 200 μ l beseruminės ląstelių kultivavimo terpės. Siekiant įvertinti vėžinių ląstelių infiltracijos ir tolimesnio gydymo efektyvumą, buvo atliekama pelių periferinio kraujo tėkmės citometrinė analizė. Naudoti antikūnai prieš žmogaus kilmės ląstelių paviršinius žymenis CD15, CD33 ir CD45 (darbo metodai analogiški aprašytiems poskyryje 3.4.3.). Mėginiai analizuoti *FACSCanto II* sistema, naudojant *FACSDiva 6.0* programinę įrangą. Kiekvienam mėginiui registruota 10 000 įvykių. Nespecifinė fluorescencija įvertinta naudojant nedažytą kontrolinį mėginį, nespecifiniam antikūnų prisijungimui įvertinti panaudotas pelės FITC-IgG1.

Bendrieji ksenograftinių pelių periferinio kraujo sudėties pokyčiai įvertinti ištyrus į mikrokapiliarus surinktą periferinį kraują (naudotas *Exigo EOS* hematologinis analizatorius, vadovautasi gamintojo instrukcijomis).

3.4.17.2. *ŪPL ksenograftinių pelių gydymas*

ŪPL ksenograftinės pelės suskirstytos į 2 grupes. Trys iš jų toliau niekuo neveiktos ir naudotos kaip kontrolinės ŪPL ksenograftinės pelės (žymima „ŪPL“). Likusios trys (žymimos „ŪPL-DBR“) pradėtos gydyti tuomet, kai periferiniame kraujyje aptikti žmogaus ląstelių CD15, CD33 ir CD45 paviršiniai žymenys ir užfiksuota žmogaus *WT1*, *PML-RARA*, *CSF* ir *CSFR* genų raiška. Pelės gydytos belinostato ir DZNep kombinacija (20 mg/kg Bel + 1 mg/kg DZNep; iš viso: 5 injekcijos *i. p.* (po pilvaplove;

angl.: *intraperitoneal injection*), 5 k./sav.). Po savaitės gydymas pratęstas oraliniu būdu pateikiant RA (0,45 mg/d., 5 k./sav., iš viso 20 k.).

3.4.17.3. *Genų raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu*

RNR iš periferinio pelių kraujo išskirta su *Quick-RNA MicroPrep* rinkiniu, vadovaujantis gamintojo instrukcijomis. RNR transkribuota į kDNR naudojant rinkinį *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit*. Visos kitos procedūros atliktos, kaip nurodyta anksčiau (poskyris 3.4.7.).

3.4.17.4. *Baltymų raiškos įvertinimas*

Pelių augliai ir audiniai, paimti iš kontrolinių pelių ir ksenograftinių pelių, iki baltymų išskyrimo užšaldyti ir saugoti -80°C temperatūroje. Tirti mėginiai (apie 50–70 mg) užšaldyti skystame azote, piestele sutrinti tiglyje, pernešti į 2,0 ml tūrio mėgintuvėlius ir lizuoti per švirkšto adatą (G23) su 20 tūrių SDS mėginio buferio. Lizatai nuskaidrinti 20 min. centrifuguojant 19 280 g esant $+4^{\circ}\text{C}$. Baltymai išsodinti acetonu ir ištirpinti SDS mėginio buferyje. Visos kitos procedūros atliktos, kaip nurodyta anksčiau (poskyriai 3.4.14. ir 3.4.15.).

3.4.18. **Statistinė analizė**

Duomenų statistinei analizei atlikti naudota *Excel* programa (2003 versija). Atliekant statistinę analizę gauti duomenys pateikti kaip aritmetinis vidurkis \pm standartinis nuokrypis. Skirtumų tikimybė tarp lyginamų grupių apskaičiuota pasitelkus *Student* porinį t-kriterijų (vertinant priklausomas imtis). Statistiniai skirtumai reikšmingais laikyti tie, kurių $p < 0,05$.

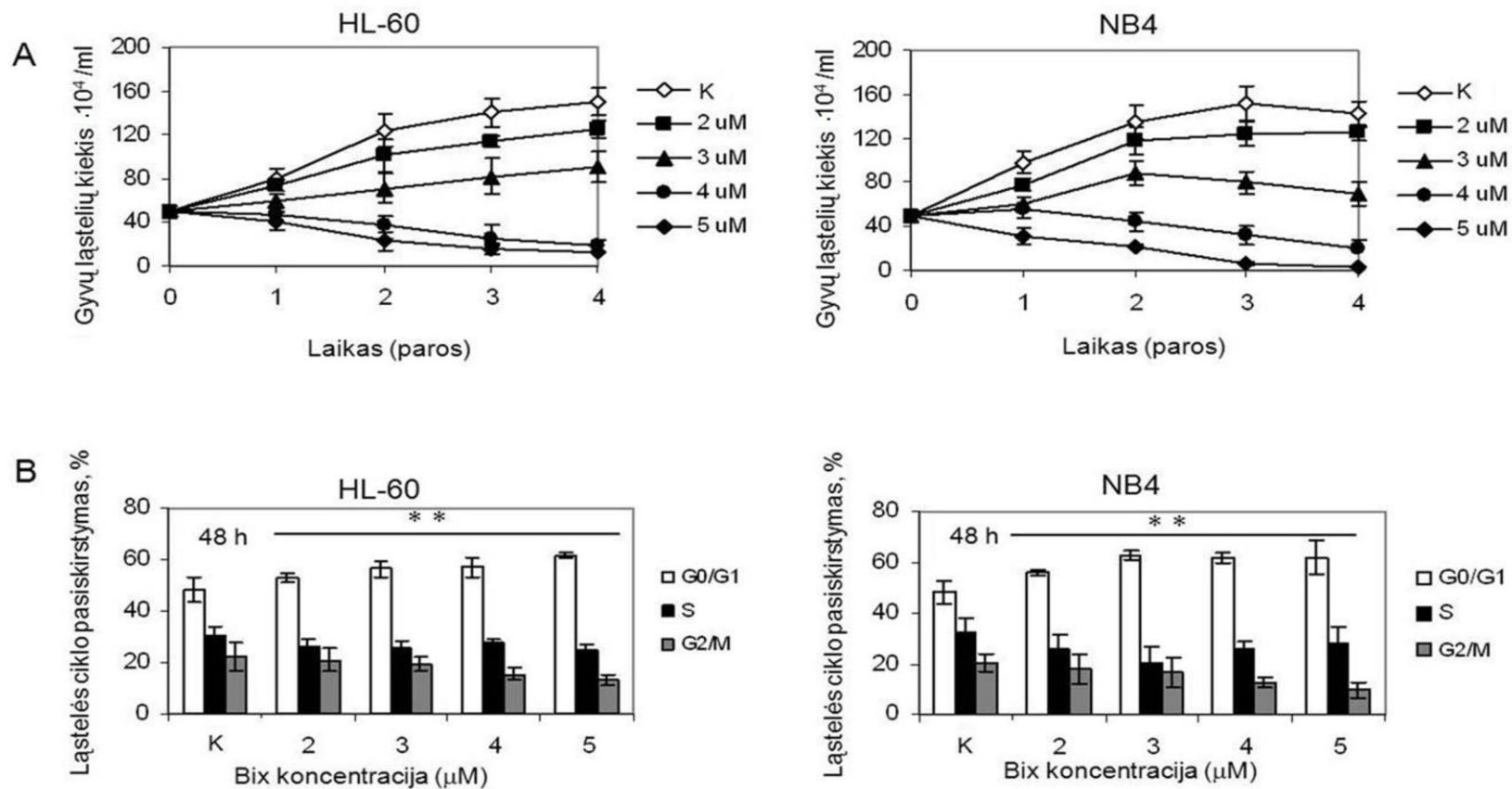
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1. BIX-01294 įtaka žmogaus ŪPL ląstelėms

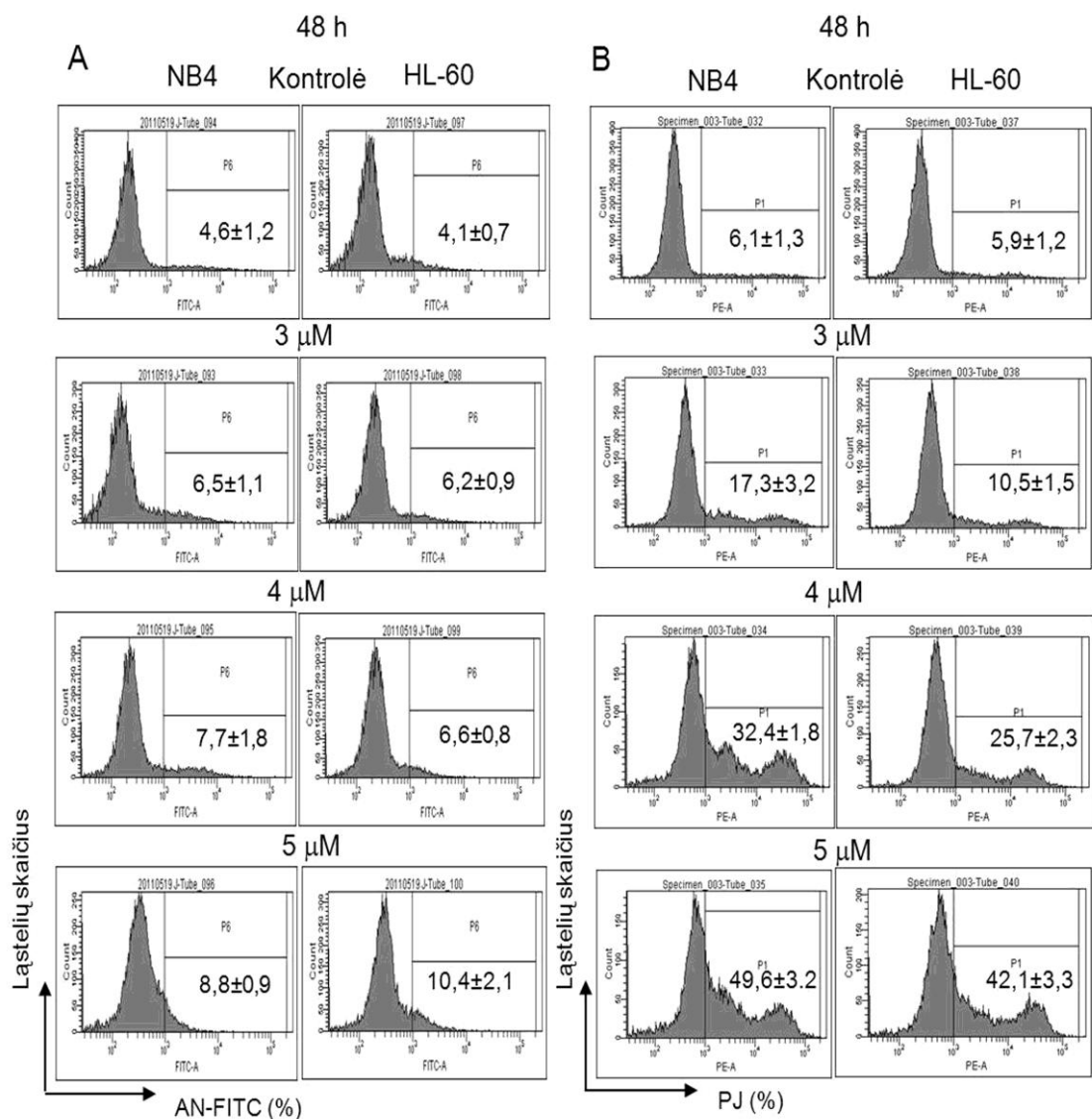
4.1.1. BIX-01294 įtaka ląstelių augimui ir išgyvenamumui

Antileukeminį BIX-01294 (Bix) aktyvumą įvertinome pasitelkę dvi skirtingas žmogaus ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių linijas – HL-60 ir NB4. Parodėme, jog Bix, priklausomai nuo naudotos koncentracijos (2–5 μM), nuslopina abiejų ląstelių linijų augimą, o jau nuo antros tyrimo paros, po poveikių didelėmis koncentracijomis (4–5 μM), statistiškai reikšmingai sumažina ir ląstelių gyvybingumą (4.1.1.1A pav.) (Savickiene ir kt., 2014a). Ląstelės ciklo analizė (4.1.1.1B pav.) parodė, kad po 48 val. poveikio įvairiomis Bix koncentracijomis išaugo ląstelių populiacijos dalis G0/G1 ciklo fazėje. Taip pat pastebėta, jog, priklausomai nuo naudotos Bix koncentracijos, sumažėjo ląstelių kiekis G2/M ciklo fazėje (apytiksliai 1,6–2 karto).

Atlikus tėkmės citometrinių tyrimą (4.1.1.2 pav.) paaiškėjo, kad po 48 val. poveikio Bix, priklausomai nuo naudotos koncentracijos, reikšmingai išaugo propidžio jodidu (PJ) nusidažiusių ląstelių skaičius (negyvų ląstelių), o ląstelių, nusidažiusių Aneksinu-V (apoptozinių ląstelių), skaičius padidėjo tik nežymiai. Po poveikių su 4–5 μM Bix beveik pusė ląstelių populiacijos (42–49 %) žuvo, visgi apoptozinių ląstelių aptikta labai nedaug – tik apie 10 %. Tai, savo ruožtu, leidžia nuspėti, jog ląstelių žūtis didžiaja dalimi buvo nulemta ne apoptozės, o galimai kitų ląstelės žūties mechanizmu.



4.1.1.1 pav. Nuo koncentracijos priklausomas BIX-01294 poveikis HL-60 ir NB4 ląstelių dauginimuisi. Ląstelės keturias paras veiktos nurodytomis BIX-01294 koncentracijomis (2, 3, 4, 5 μ M). **(A)** Gyvų ląstelių kiekis nustatytas kas dieną ląsteles nudažius 0,2 % tripano mėliu ir nusidažiusių ląstelių skaičių įvertinus hematocitometru. **(B)** Ląstelės ciklo tėkmės citometrinių analizė. Ląstelių pasiskirstymas G0/G1, S ir G2/M ciklo fazėse po 48 val. poveikių nurodytomis BIX-01294 koncentracijomis. Duomenys suvidurkinti, \pm SN (n = 3), $p \leq 0,001$ (**) žymi reikšmingus skirtumus nuo neveiktų ląstelių mėginių (Savickiene ir kt., 2014a).

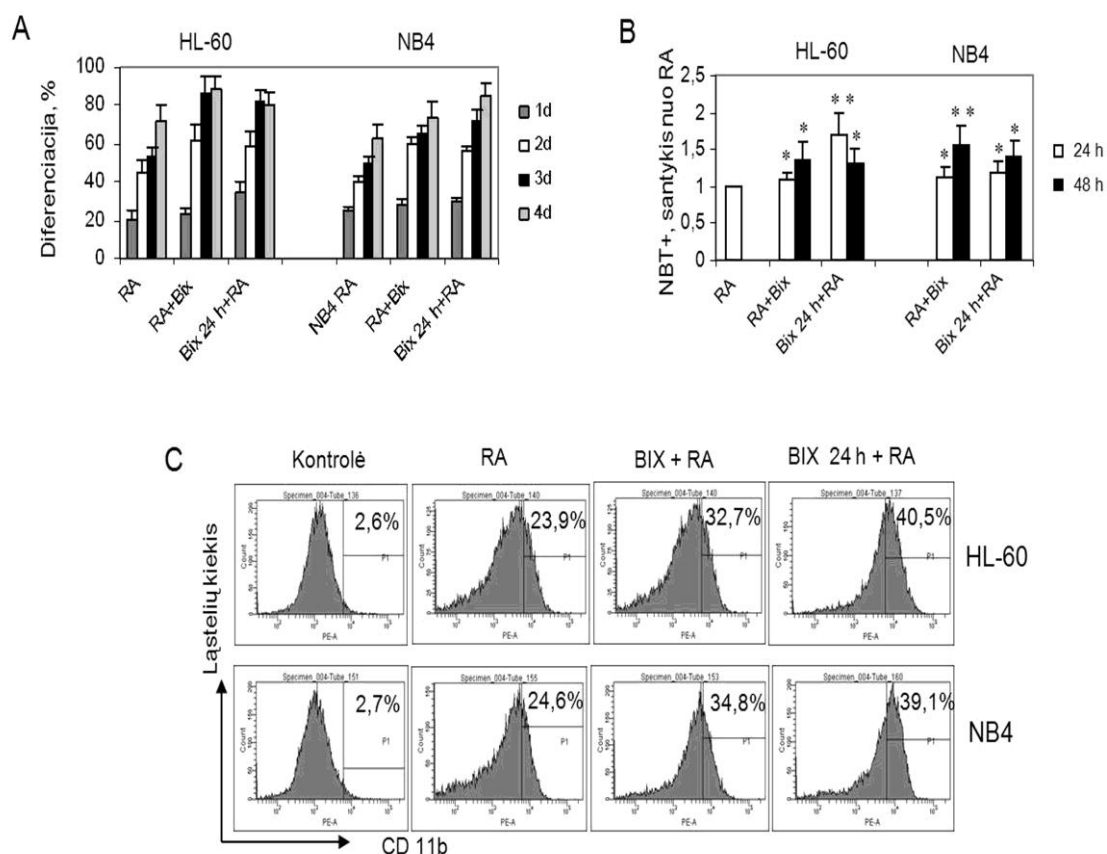


4.1.1.2 pav. Nuo koncentracijos priklausomas BIX-01294 citotoksiškumas HL-60 ir NB4 ląstelėms. Po 48 val. poveikių nurodytomis BIX-01294 koncentracijomis atlikta dvigubo dažymo Aneksinu-V-FITC (A) ir PJ (B) tėkmės citometrinė ląstelių žūties analizė. Nurodytas procentas ląstelių, nusidažiusių Aneksinu-V-FITC ir PJ (PJ signalas registruotas fikoeritrino (angl.: PE) kanalu). Duomenys suvidurkinti, \pm SN (n = 3) (Savickiene ir kt., 2014a).

4.1.2. BIX-01294 įtaka RA indukuotai ląstelių diferenciacijai

Taip pat įvertinome Bix įtaką HL-60 ir NB4 ląstelių diferenciacijai. Šiuo tikslu ląsteles 4 paras veikėme netoksiška (2 μM) šio junginio koncentracija kartu su 1 μM RA (sutrumpintai: Bix + RA; toliau šis poveikis vadinamas *vienalaikiu poveikiu*). Kaip parodė NBT testas, toks *vienalaikis poveikis* sustiprino abiejų ląstelių linijų diferenciaciją (4.1.2.1 pav.). Panašūs rezultatai gauti ir tuomet, kai ląstelės 24 val. buvo paveiktos 2 μM Bix, po to nuplautos ir

toliau kultivuotos augimo terpėje su 1 μ M RA (sutrumpintai: Bix (24 h) \rightarrow RA; toliau šis poveikis vadinamas *palaiptiniu poveikiu*). Prabėgus 48 val. po tokio *palaiptinio poveikio*, diferencijavusių ląstelių skaičius išaugo apytiksliai 1,4 karto, palyginus su poveikiu viena RA (4.1.2.1B pav.). Po 4 parų užfiksuota, jog visi kombinuoti poveikiai padėjo pasiekti maksimalų registruotą 80–85 % NBT redukavimo efektyvumą, o po poveikio viena RA ši vertė atitinkamai siekė 60–70 %. Pažymėtina, jog pats vienas Bix neindukavo HL-60 ir NB4 ląstelių diferenciacijos (duomenys nepateikti).

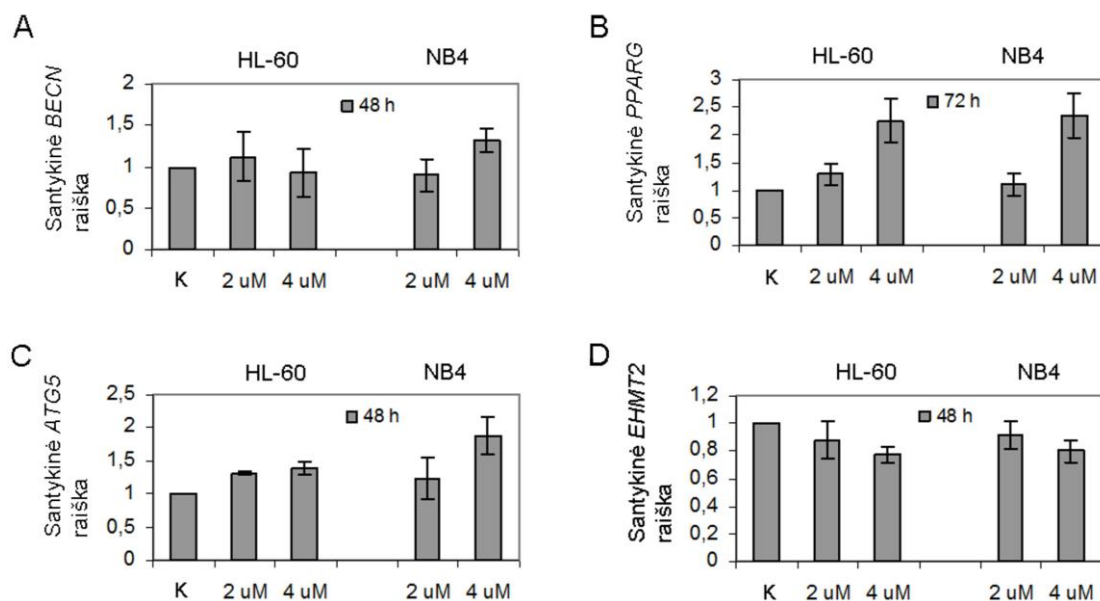


4.1.2.1 pav. BIX-01249 įtaka RA indukuotai granulocitinei HL-60 ir NB4 ląstelių diferenciacijai. **(A)** Ląstelės buvo veiktos 2 μ M BIX-01294 kartu su 1 μ M RA (RA + Bix) arba paveiktos 2 μ M BIX-01294, nuplautos ir toliau kultivuotos terpėje su 1 μ M RA (Bix 24 h + RA). Granulocitinė diferenciacija išreikšta NBT teigiamų ląstelių procentu nuo gyvų ląstelių skaičiaus ar **(B)** kaip santykis su RA paveikta kontrole. Duomenys suvidurkinti, \pm SN (n = 3), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) žymi reikšmingus skirtumus nuo RA paveiktų kontrolinių ląstelių. **(C)** CD11b paviršinio žymens raiška po 48 val. *vienalaikio* ir *palaiptinio poveikio* 2 μ M BIX-01294 ir 1 μ M RA. Pateikti rezultatai iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų (Savickiene ir kt., 2014a).

Tėkmės citometriniis ląstelės paviršinių žymenų tyrimas (4.1.2.1C pav.) parodė, kad po 24 val. *vienalaikio poveikio*, palyginus su poveikiu viena RA, išaugo CD11b paviršinių žymenų turinčių NB4 ir HL-60 ląstelių skaičius (atitinkamai 1,41 ir 1,37 karto). Po *palaipsninio poveikio* padidėjimas siekė atitinkamai 1,59 ir 1,69 karto. Šie duomenys patvirtina, jog Bix efektyviai sužadina RA indukuotą promielocitinės leukemijos ląstelių diferenciaciją.

4.1.3. BIX-01249 įtaka ląstelių genų ir baltymų raiškai

Siekdami įvertinti BIX-01294, kaip HMT slopiklio, efektyvumą, atlikome ir AT-kPGR *EHMT2* geno raiškos tyrimą (4.1.3.1D pav.). Parodėme, jog 48 val. poveikis su Bix *EHMT2* transkripto lygio nesumažina. Taip pat siekėme išsiaiškinti molekulinis mechanizmus, kuriais BIX-01294 prisideda prie neapoptozinės ląstelių žūtis. Įvertinome Beklino 1, žymens, kuris nurodo ląstelių žūtį autofagijos būdu (Maskey ir kt., 2013), geno *BECN1* raiškos pokyčius po poveikių Bix. Gauti rezultatai parodė, jog, ŪPL ląsteles 48 val. paveikus įvairiomis Bix koncentracijomis, *BECN1* transkripto lygis stipriai nepakinta (4.1.3.1A pav.). Taip pat tyrėme ir PPAR γ (veiksni, svarbaus ląstelių augimui ir išgyvenimui (Gan ir kt., 2008)) geno *PPARG* raiškos pakitimus. Kaip parodyta 4.1.3.1B pav., mažos Bix koncentracijos (2 μ M) nepakeitė *PPARG* geno raiškos. Visgi po 72 val. poveikio 4 μ M Bix HL-60 ir NB4 ląstelėse *PPARG* transkripto lygis išaugo 2,3 karto. Atsižvelgdami į tai, kad ląstelių žūtis po 48 val. poveikio citotoksiškoms Bix koncentracijomis gali būti susijusi su ląstelės ciklo sutrikdymu G1 fazėje, mes taip pat įvertinome ir *ATG5* geno raišką – geno, kurio koduojamas baltymas dalyvauja nuo autofagijos nepriklausomos priešvėžinių vaistų sukeltos mitotinės katastrofos procesuose (Han ir kt., 2010). Palyginus su neveikta kontrole, po poveikio su 4 μ M Bix NB4 ląstelėse *ATG5* transkripto lygis pastebimai išaugo (1,9 karto), visgi HL-60 ląstelėse padidėjimas buvo ne toks stiprus (1,4 karto; 4.1.3.1C pav.).

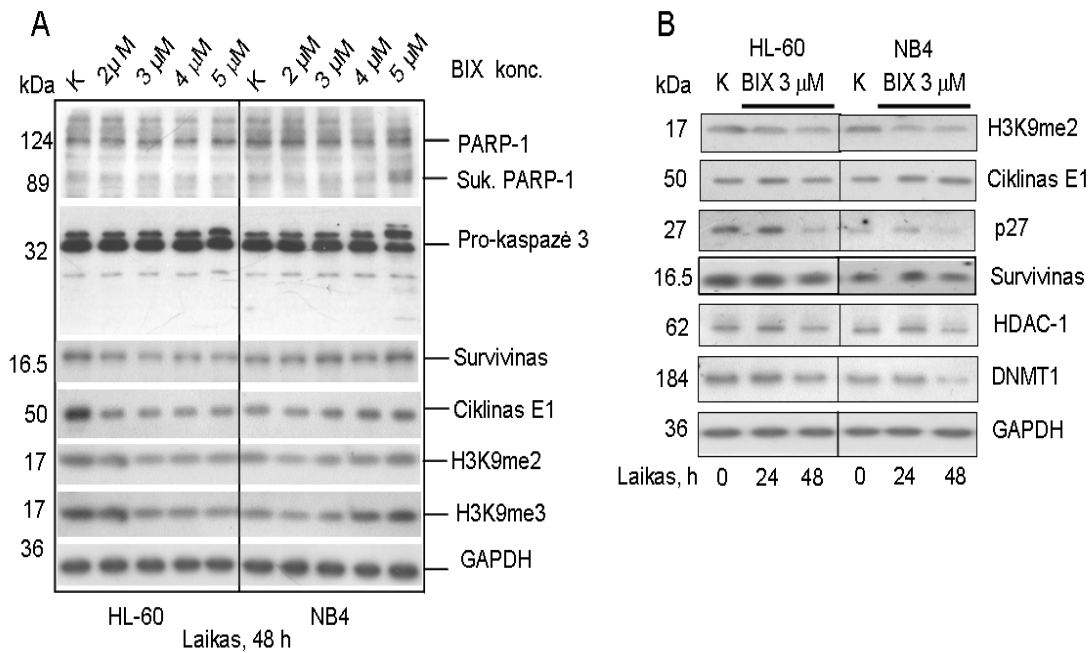


4.1.3.1 pav. Ląstelės žūtį reguliuojančių genų raiška HL-60 ir NB4 ląstelėse, kultivuotose su BIX-01294. Ląstelės nurodytą laiką buvo veiktos 2 ir 4 μ M Bix. (A) *BECN1*, (B) *PPARG*, (C) *ATG5* ir (D) *EHMT2* raiškos lygis įvertintas AT-kPGR metodu. Duomenys buvo normalizuoti pagal *GAPDH* lygį ir pateikti kaip santykiniai dydžiai nuo neveiktos kontrolės. Gauti rezultatai suvidurkinti, \pm SN (n = 3) (Savickiene ir kt., 2014a).

Baltymų imuninė analizė, naudojant įvairiomis BIX-01294 koncentracijomis paveiktų HL-60 ir NB4 ląstelių bendruosius lizatus (4.1.3.2A pav.), patvirtino, jog ląstelės po šių poveikių žuvo ne apoptozės būdu. Po 48 val. poveikio vis didesnėmis BIX-01294 koncentracijomis išaugo žuvusių ląstelių skaičius (4.1.1.2 pav.), tačiau prokaspazės 3 virsmo į aktyvią formą – kaspazę 3 – neregistruota (4.1.3.2A pav.). Taip pat neaptikta ir sukurpyto PARP-1 (tik silpnas signalas NB4 ląstelėse po poveikio su 5 μ M Bix) (4.1.3.2A pav.).

Svarbu pažymėti, jog poveikis su Bix sukėlė ląstelės tipui specifiskus ir nuo naudotos koncentracijos priklausomus koordinuotus H3K9me2, survivino ir ciklino E1 raiškos lygio pakitimus (4.1.3.2A pav.). Tai, savo ruožtu, galimai turėjo įtakos ir G1/S fazės reguliavimui. Stebėtina tai, jog 48 val. poveikis 4–5 μ M Bix padidino ciklino E1, H3K9me2 ir H3K9me3 kiekį išskirtinai tik NB4 ląstelėse. Taip pat NB4 ląstelėse stipriai išaugo ir *PPARG* bei *ATG5* genų raiška (4.1.3.1B,C pav.). Šie duomenys koreliavo ir su NB4 ląstelių ciklo

sustabdymu S fazėje (4.1.1.1B pav.). Reikėtų paminėti, kad vidutinio dydžio 3 μM Bix koncentracija po 48 val. poveikio sumažino H3K9me2 kiekį abiejose ląstelių linijose. Taip pat tiek NB4, tiek HL-60 ląstelėse pastebėti panašūs p27, survivino ir chromatiną modifikuojančių fermentų HDAC1 ir DNMT1 baltymų kiekio pokyčiai (4.1.3.2B pav.).



4.1.3.2 pav. BIX-01294 sukelti ląstelės ciklą ar išgyvenimą reguliuojančių baltymų raiškos bei histono H3K9 modifikacijos pokyčiai. (A, B) HL-60 ir NB4 ląstelės veiktos nurodytomis BIX-01294 koncentracijomis 24 ir 48 val. Baltymų imuninė analizė atlikta naudojant bendruosius ląstelių lizatus. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Pateikti duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų, kurių metu buvo gauti panašūs rezultatai (Savickiene ir kt., 2014a).

4.1.4. Rezultatų aptarimas

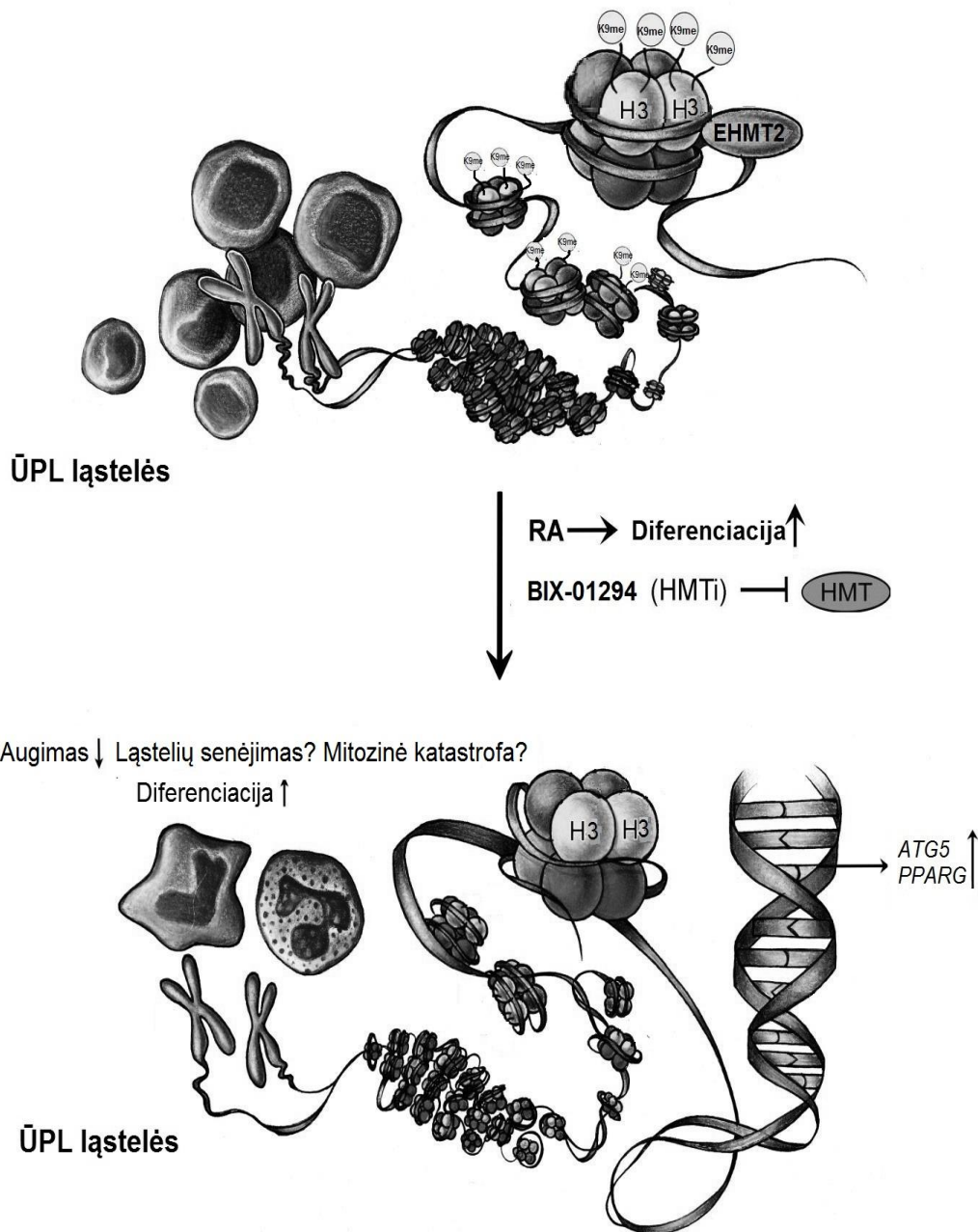
Šio tyrimo metu pirmą kartą parodėme, jog poveikis histonų metiltransferazių slopikliu BIX-01294 žmogaus promielocitinės leukemijos ląstelėse HL-60 ir NB4 sumažina H3K9me2 epigenetinės žymės kiekį (4.1.3.2 pav.). Po poveikio BIX-01294 taip pat sutrinkdama ir šių ląstelių ciklo eiga bei sustiprinama RA indukuota granulocitinė diferenciacija (4.1.1.1 pav. ir 4.1.2.1 pav.). Parodėme, jog HL-60 ir NB4 ląstelės, sustojusios G1/S ciklo fazėje, negeba toliau dalytis ir vėliau žūsta, tačiau ne apoptozės būdu. HL-60 ir NB4 ląstelėse, sumažėjus H3K9me2 modifikacijos kiekiui, pakito ir G1/S

ląstelės ciklo fazės reguliatorių, ciklino E1 ir nuo ciklinų priklausomų kinazių slopiklio p27, raiška (4.1.3.2 pav.). Ląstelių žūtis ne apoptozės būdu po poveikio citotoksiškoms BIX-01294 dozėmis patvirtinta atlikus tėkmės citometrinių tyrimų, įvertinantį ląstelių nusidažymą Aneksinu ir PJ (4.1.1.2 pav.). Pastarieji rezultatai taip pat koreliavo ir su baltymų imuninės analizės duomenimis: neaptikome sukarpyto PARP-1 ir aktyvuotos kaspazės-3 (4.1.3.2A pav.). Apibendrinti BIX-01294 tyrimo rezultatai pateikti 4.1.4.1 pav.

Parodyta, jog poveikis BIX-01294 skirtingas vėžio ląsteles veikia nevienodai. Adenokarcinomos ląstelėse BIX-01294 indukuoja apoptozės procesus, sužadindamas vidinį (mitochondrinį) kelią (Wan ir kt., 2017). Krūties ir tiesiosios žarnos vėžio ląstelėse poveikis BIX-01294 sukelia nuo autofagijos priklausomą ląstelių žūtį (Kim ir kt., 2013). Ankstesniais tyrimais (Kondo ir kt., 2008) parodyta, kad RNR interferencija paremtas *EHMT2* nutildymas sukelia ryškius vėžinių ląstelių (prostatos, plaučių ir krūties vėžio) morfologijos pokyčius, padidina β -galaktozidazės raišką bei nuslopina telomerazės aktyvumą. Dėl stipriai sumažėjusio H3K9me2 kiekio centromerinėje chromatinio dalyje suardoma ir pačių centromerų struktūra. Chromosomų nestabilumas, savo ruožtu, toliau gali vesti prie ląstelių senėjimo (Andriani ir kt., 2016). Mūsų gauti *ATG5* ir *PPARG* genų raiškos tyrimų rezultatai – akivaizdus šių genų raiškos sustiprėjimas po poveikio BIX-01294 (4.1.3.1B–C pav.) – leidžia manyti, jog BIX-01294 NB4 ir HL-60 ląstelėse galimai sužadina ląstelinio senėjimo procesus. Yra žinoma, jog PPAR γ aktyvavimas atlieka reikšmingą vaidmenį signalinių senėjimo kelių reguliacijoje (Altucci ir kt., 2001; Lu ir kt., 2005). Itin svarbu paminėti, kad PPAR γ , kartu išaugus ir survivino raiškai, nuslopina *TRAIL* indukuotą apoptozę (Li ir kt., 1998), o būtent šiuo keliu NB4 ląstelės dažniausiai ir žūva (Castedo ir kt., 2004). *ATG5*, savo ruožtu, yra būtinas nuo autofagijos nepriklausomai mitozinei katastrofai, kuri vėžio ląstelėse pasireiškia po poveikių nemirtinomis DNR pažeidžiančių vaistų ar antimitoziškai veikiančių cheminių junginių dozėmis (Han ir kt., 2010). Yra parodyta, kad citozolyje aptinkamas *ATG5* prisideda reguliuojant autofagijos procesus, o branduolyje

esantis ATG5 baltymas geba indukuoti mitozinės katastrofos virsmus (dėl ATG5 sąveikos su survivinu sutrikdomas tvarkingas chromosomų išsidėstymas ir chromosomos nebegeba teisingai atsiskirti (Han ir kt., 2010)). Kaip žinoma, survivinas ne tik apsaugo ląsteles nuo apoptozės vidiniu (mitochondrinu) keliu, tačiau taip pat reguliuoja ląstelių dalijimąsi ir dalyvauja mitozinės verpstės patikros procesuose (Chang ir kt., 1999; Dohi ir kt., 2004; Vernier ir kt., 2011). Ir mūsų tyrimų metu aptikta, jog, NB4 ląsteles paveikus BIX-01294 ir ląstelėms nebepajėgiant pereiti į G2/M ciklo fazę (4.1.1.1 pav.), survivino baltymo kiekis šiek tiek išauga (4.1.3.2 pav.). Šie rezultatai teigiamai koreliavo ir su konstitutyvaus heterochromatino žymens H3K9me3 kiekiu padidėjimu (4.1.3.2 pav.). Reikėtų pažymėti, jog nevienodas HL-60 ir NB4 ląstelių atsakas į žudančias BIX-01294 koncentracijas galimai priklauso nuo p53 baltymo – kaip jau minėta anksčiau, NB4 ląstelėse šio baltymo aptinkama, o HL-60 ląstelėse jo raiška visai nevyksta, dėl ko pastarosios ląstelės ir yra mažiau jautrios senėjimą skatinantiems veiksniams (Lekstrom-Himes, 2001). Be kita ko, PML baltymas per PML/Rb/E2F signalinį kelią (Truong ir kt., 2003) galimai dalyvauja ir inicijuojant bei palaikant ląstelinio senėjimo procesus NB4 ląstelėse.

Young ir kt. (2009) parodė, kad senėjimo procesų metu yra indukuojami ir autofagijos signaliniai keliai. Pastarieji dar labiau sustiprina senėjimo procesus. Anksčiau atlikti tyrimai (Kim ir kt., 2013) atskleidė, kad vėžio ląsteles paveikus BIX-01294 suintensyvėja aktyvių deguonies formų (angl.: ROS) gamyba, o tai, savo ruožtu, toliau geba paskatinti autofagijos vyksmus. Park ir kt. (2016) atliktas tyrimas parodė, kad po poveikio BIX-01294, nuslopus EHMT2 aktyvumui, MCF-7 ląstelėse stipriai išauga *BECNI* geno raiška. Mes taip pat įvertinome šio svarbaus autofagijos procesams geno raišką NB4 ir HL-60 ląstelėse po poveikių BIX-01294 (4.1.3.1A). Visgi mūsų gauti rezultatai neparodė ryškios BIX-01294 įtakos *BECNI* geno raiškai minėtose ŪPL ląstelėse.



4.1.4.1 pav. Epigenetinės terapijos, naudojant BIX-01294 atskirai ir kartu su RA, poveikio ŪPL ląstelėms (NB4 ir HL-60) apibendrinta iliustracija. Kaip parodyta, BIX-01294 sustabdė ŪPL ląstelių augimą. Taip pat BIX-01294 sustiprino RA indukuotą leukemijos ląstelių granulocitinę diferenciaciją. Poveikis BIX-01294, priklausomai nuo koncentracijos, pasižymėjo citotoksiškumu ŪPL ląstelėms. Pademonstruota, kad po poveikio BIX-01294 ŪPL ląstelės žūsta ne apoptozės būdu. BIX-01294 NB4 ir HL-60 ląstelėse taip pat sumažino histono H3K9me2 modifikacijos kiekį. Ląsteles paveikus BIX-01294, pastebėtas ir genų *ATG5* bei *PPARG* raiškos sustiprėjimas (modifikuota pagal Valiulienė ir kt., 2017).

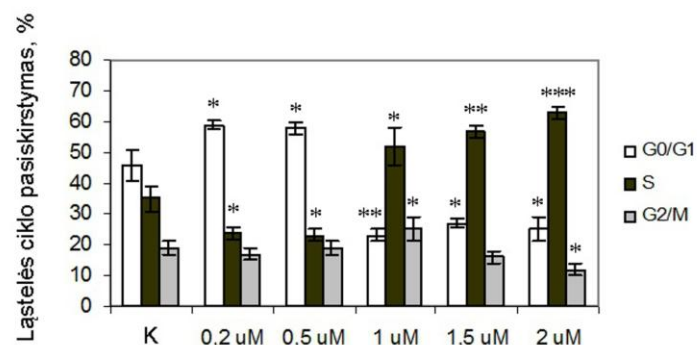
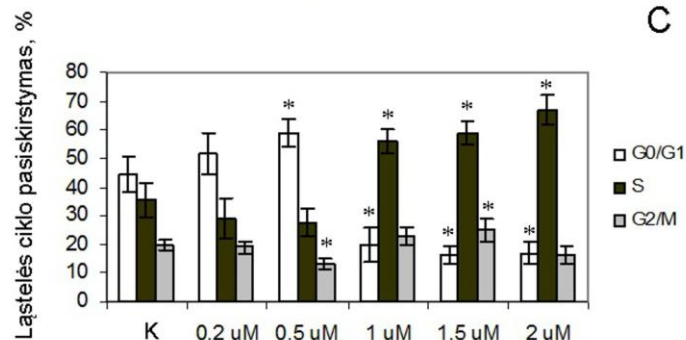
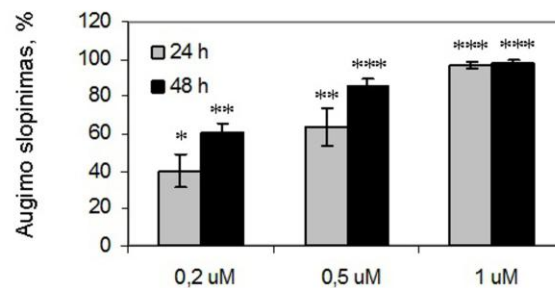
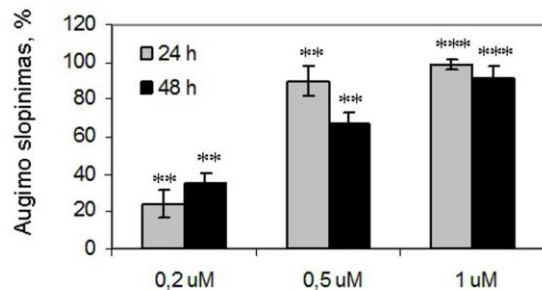
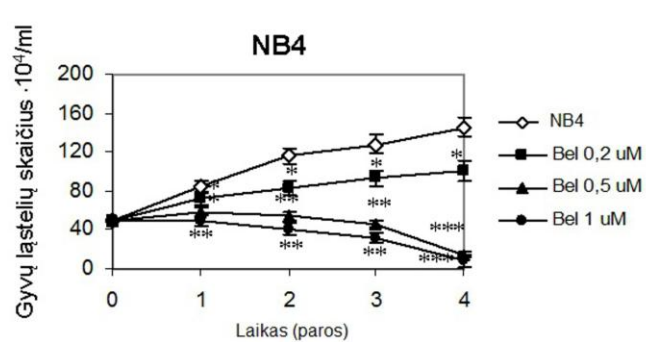
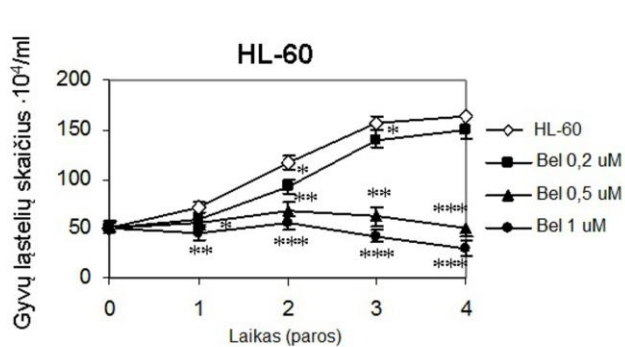
Apibendrinant šiuos rezultatus, galime pasakyti, kad EHMT2 aktyvumo nuslopinimas gali būti išskiriamas kaip dar vienas svarbus mechanizmas, paaiškinantis HL-60 ir NB4 ląstelių augimo sustabdymą ir diferenciacijos sustiprėjimą. Toliau įvertinome HDACi belinostato poveikį NB4 ir HL-60 ląstelėms.

4.2. Belinostato įtaka žmogaus ŪPL ląstelėms

4.2.1. Belinostato įtaka ląstelių augimui ir išgyvenamumui

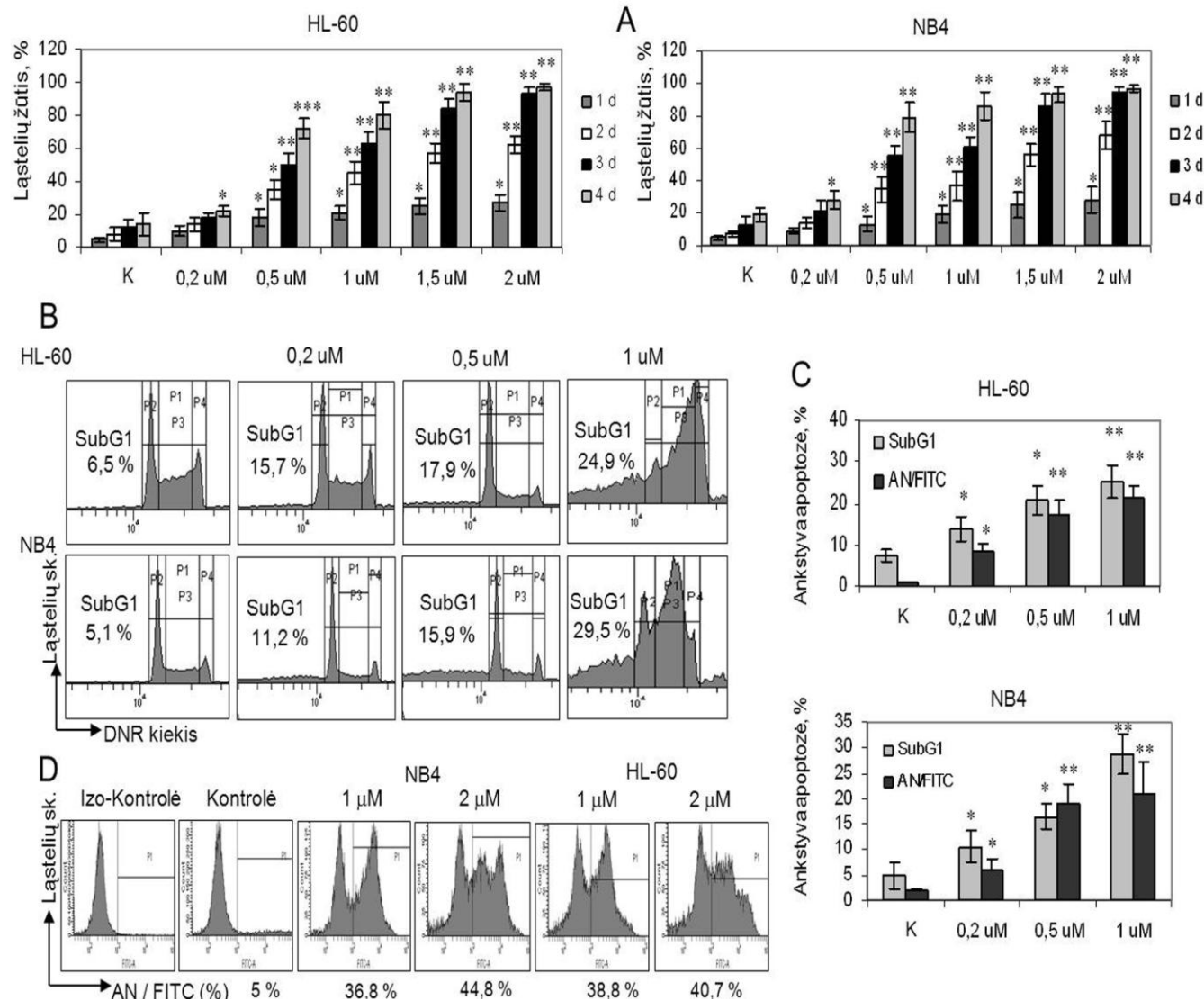
Belinostato (Bel) įtaką leukemijos ląstelių proliferacijos nuslopinimui įvertinome naudodami skirtingas šio junginio koncentracijas (0,2–1 μM) (Savickiene ir kt., 2014b; Valiuliene ir kt., 2015). Ląstelės Bel veiktos 4 paras. Pastebėta, jog Bel, priklausomai nuo koncentracijos ir poveikio trukmės, nuslopiną ląstelių dauginimąsi. Stipriausias efektas buvo pasiektas NB4 ląstelėse (4.2.1.1A pav.). Su 1 μM Bel po 24 ir 48 val. poveikio augimo slopinimas siekė iki 90 % (4.2.1.1B pav.).

Taip pat įvertinome Bel įtaką ląstelės ciklo eigai. Tėkmės citometriniu, HL-60 ir NB4 ląstelių DNR kiekį įvertinantis, tyrimas atliktas po 24 val. poveikio nurodytomis Bel koncentracijomis (4.2.1.1C pav.). Mažos Bel koncentracijos (0,2–0,5 μM) padidino ląstelių kiekį G0/G1 ciklo fazėje (8–12 %), o S fazės dalis sumažėjo. Didesnės koncentracijos (1–2 μM), priešingai, ląstelių skaičių S ciklo fazėje padidino (iki 56–63 %), o G0/G1, tiek ir G2/M fazėje, sumažino (iki 12–16 %). Po 48 val. poveikio (duomenys nepateikti) ląstelių skaičius G0/G1 ir G2/M ciklo fazėse atitinkamai tesiekė 9 % ir 3 %, kas byloja apie tai, jog Bel paveiktų ląstelių ciklas buvo sustabdytas S ciklo fazėje.



4.2.1.1 pav. Nuo koncentracijos priklausoma belinostato įtaka HL-60 ir NB4 ląstelių proliferacijai. Ląstelės veiktos nurodytomis belinostato koncentracijomis 4 paras. **(A)** Gyvų ląstelių kiekis nustatytas kasdien jas nudažius 0,2 % tripano mėliu ir suskaičiavus hematocitometru. **(B)** Ląstelių augimo stabdymo 24–48 val. procentinė išraiška. Rezultatai suvidurkinti, \pm SN ($n = 5$). **(C)** Tėkmės citometrinė ląstelės ciklo analizė. Nurodytas ląstelių pasiskirstymas G0/G1, S ir G2/M fazėse (%) po 24 val. poveikio belinostatu. Rezultatai suvidurkinti, \pm SN ($n = 3$); $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) žymi reikšmingus skirtumus nuo neveiktos kontrolės (Savickiene ir kt., 2014b).

Nustatėme belinostato citotoksiškumo priklausomybę nuo koncentracijos. 0,2 μM Bel nei HL-60, nei NB4 ląstelėse ryškiu poveikiu nepasižymėjo (4.2.1.2A pav.). Paveikus vidutinio dydžio koncentracija (0,5 μM), žuvusių ląstelių kiekis išaugo, o 1 μM Bel po 2 parų poveikio jau stipriai padidino žuvusių ląstelių kiekį (4.2.1.2A pav.). Parodėme, jog Bel, priklausomai nuo naudotos koncentracijos, padidina NB4 ir HL-60 ląstelių populiacijos dalį subG1 ciklo fazėje (4.2.1.2B pav.). Labiausiai subG1 populiacija išaugo ląsteles paveikus 1 μM Bel koncentracija. Atlikę dvigubo dažymo Aneksino-V-FITC ir PJ tėkmės citometrinių tyrimų, pastebėjome, jog, priklausomai nuo Bel koncentracijos, po 24 val. poveikio išauga ląstelių, perėjusių į ankstyvosios apoptozės stadiją, dalis (4.2.1.2C pav.). Šie duomenys koreliuoja ir su subG1 piko išaugimu. Ląsteles 48 val. paveikus didesnėmis Bel koncentracijomis (1 ir 2 μM), pradėjusių apoptuoti HL-60 ir NB4 ląstelių kiekis atitinkamai išaugo iki 40,7 % ir 44,8 % (4.2.1.2D pav.). Panašius duomenis gavome ir žuvusių ląstelių skaičių įvertinę tripano mėlio testu – žuvusių ląstelių kiekis išaugo priklausomai nuo naudotos koncentracijos, o daugiausia žuvusių ląstelių užfiksuota po 72–96 val. poveikio (4.2.1.2A pav.). Visi šie gauti duomenys parodo, kad belinostatas indukuoja HL-60 ir NB4 ląstelių apoptozę, sustabdydamas ląsteles S ciklo fazėje.



4.2.1.2 pav. Belinostato citotoksiškumas HL-60 ir NB4 ląstelėms. Ląstelės veiktos belinostato koncentracijomis 4 paras. **(A)** Ląstelių žūtis įvertinta nudažius 0,2 % tripano mėliu ir išreikšta procentine negyvų ląstelių dalimi nuo bendro ląstelių skaičiaus. Duomenys suvidurkinti, \pm SN (n = 6). **(B)** FACS histograma, iliustruojanti po 24 val. poveikio belinostatu atsiradusias hipodiploidines (subG1) ląstelių populiacijas. **(C)** Apoptozinių ląstelių dalis SubG1 ląstelių populiacijoje, kaip nustatyta Aneksino-V testu ir tėkmės citometriniu tyrimu. HL-60 ir NB4 ląstelės veiktos vidutinio dydžio belinostato koncentracijomis 24 val. Rezultatai suvidurkinti, \pm SN (n = 3); $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) žymi reikšmingus skirtumus nuo neveiktos kontrolės. **(D)** Ankstyvosios apoptozės dvigubo dažymo – Aneksinu-V-FITC ir PJ – tėkmės citometrinė analizė. HL-60 ir NB4 ląstelės 48 val. veiktos 1–2 μ M belinostato. Pateikta Aneksino-V-FITC teigiamų ląstelių kiekio nuo bendro ląstelių skaičiaus procentinė išraiška. Paveikslas iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų, kurių metu gauti panašūs rezultatai (Savickiene ir kt., 2014b).

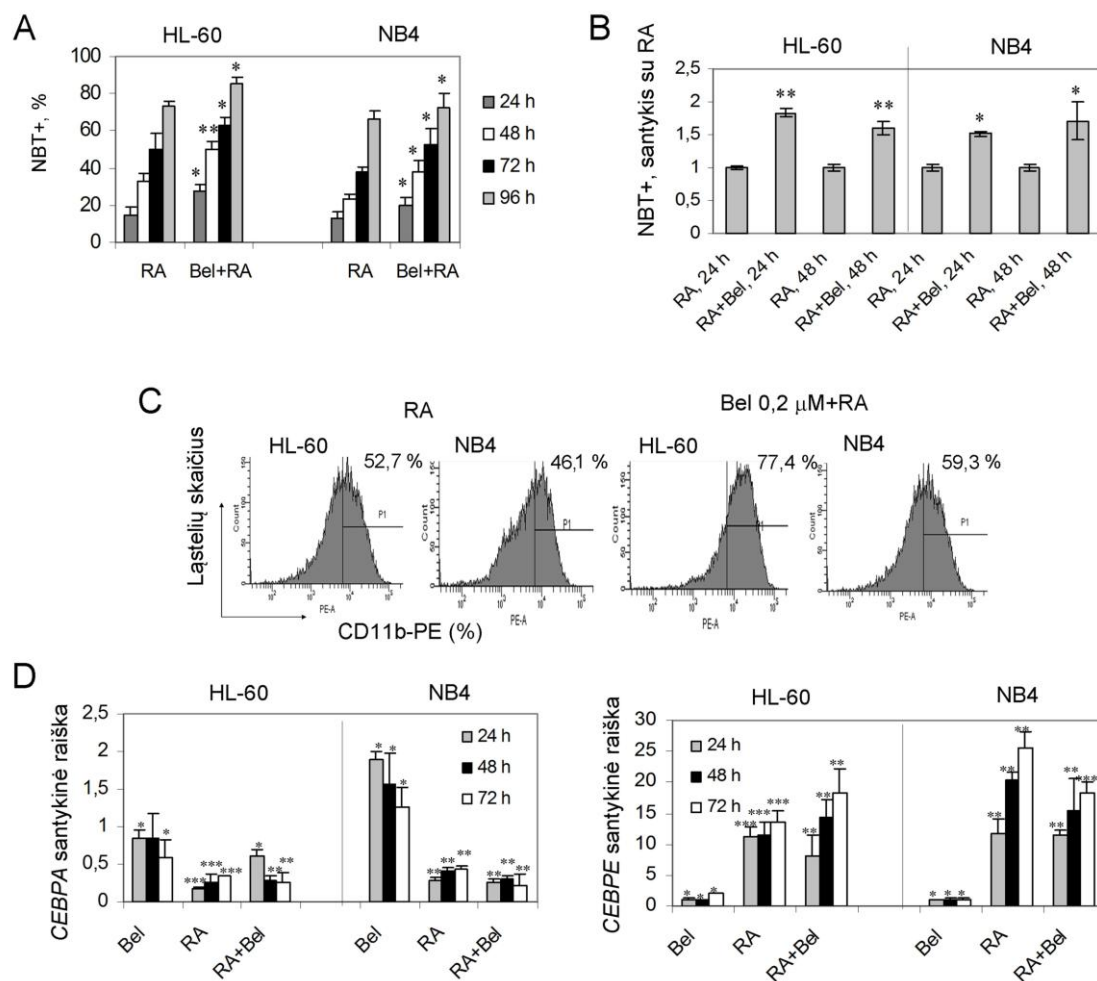
4.2.2. Belinostato įtaka RA indukuotai ŪPL ląstelių diferenciacijai

Diferenciacijos tyrimų metu HL-60 ir NB4 ląstelės veiktos farmakologine RA koncentracija (1 μ M), 0,2 μ M Bel ir šių junginių kombinacija 1 μ M RA + 0,2 μ M Bel. NBT testas ir CD11b paviršinio žymens raiškos tyrimas parodė, jog Bel, veikdamas pats vienas, NB4 ir HL-60 ląstelių granulocitinės diferenciacijos neindukuoja (duomenys nepateikti), tačiau geba sustiprinti ir paankstinti RA indukuotą diferenciaciją (4.2.2.1A pav.). Veikdamas kartu su RA, Bel po 24–48 val. poveikio padidino RA indukuotą diferenciaciją 1,5–1,8 karto (4.2.2.1B pav.). Stipriausias granulocitinės diferenciacijos paankstinimas pastebėtas HL-60 ląstelėse. Palyginus tiek RA, tiek belinostato veikimą atskirai, bendras poveikis Bel + RA nuslopino NB4 ir HL-60 ląstelių augimą ir sustabdė ląsteles G0/G1 ląstelės ciklo fazėje (Valiuliene ir kt., 2015). Tėkmės citometriniu CD11b paviršinio žymens raiškos tyrimas parodė, jog po 48 val. trukmės kombinuoto poveikio didelei daliai ląstelių populiacijos šis žymuo yra būdingas (HL-60 ir NB4 ląstelėse atitinkamai 77,4 % ir 59,3 %) (4.2.2.1C pav.).

Taip pat įvertinome Bel, vieno ir kombinacijoje su RA, poveikį transkripcijos veiksnių C/EBP α (angl.: *CCAAT/enhancer binding protein α*) ir C/EBP ϵ genų raiškai (4.2.2.1D pav.). Reikėtų paminėti, kad C/EBP α ir C/EBP ϵ yra svarbūs ląstelės ciklo eigai ir granulocitinei diferenciacijai (Friedman ir kt., 2003; Nakajima ir kt., 2006). C/EBP α veikimas yra būtinas pradinėse diferenciacijos stadijose, o jau diferencijuotose ląstelėse C/EBP α raiška sumažėja (Friedman, 2015).

AT-kPGR tyrimas parodė, kad 0,2 μ M Bel NB4 ląstelėse po 24–48 val. poveikio sužadino *CEBPA* iRNR raišką. RA, viena ir kartu su Bel, reikšmingai nuslopino *CEBPA* iRNR raišką abiejose ląstelių linijose. Pažymėtina, jog Bel pats vienas neturėjo didelės įtakos *CEBPE* geno raiškai. O 24 val. poveikis viena RA ir RA kombinacijoje su Bel *CEBPE* geno raišką padidino dešimteriopai tiek NB4, tiek ir HL-60 ląstelėse. Po poveikio *CEBPE* geno raiška palaipsniui didėjo ir piką (padidėjimą 15–25 kartus)

pasiekė po 72 val., kuomet didžioji dauguma ląstelių jau buvo diferencijavusios. Visgi NB4 ląstelėse, skirtingai nei HL-60 ląstelėse, kombinuotas poveikis *CEBPE* iRNR raišką indukavo silpniau nei poveikis viena RA. Apibendrinant AT-kPGR tyrimų rezultatus, galima pasakyti, jog NB4 ir HL-60 ląstelių granulocitinę diferenciaciją lydėjo *CEBPA* ir *CEBPE* raiškos pokyčiai.

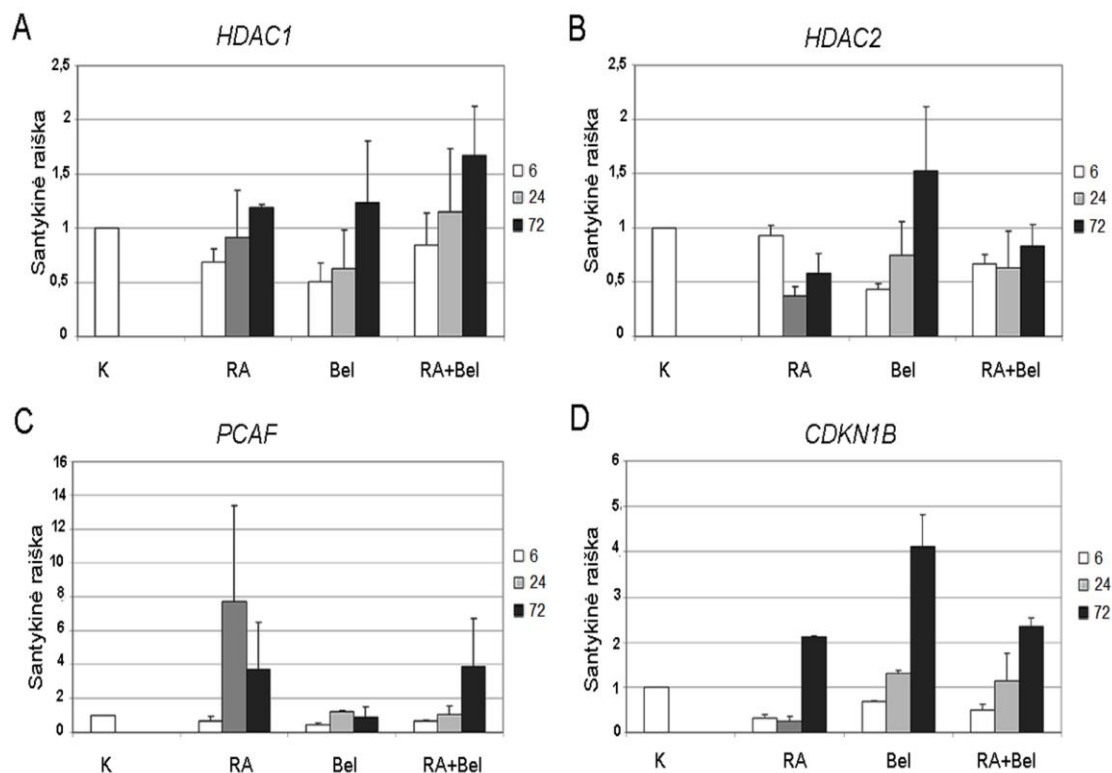


4.2.2.1 pav. Belinostato įtaka RA indukuotai HL-60 ir NB4 ląstelių granulocitinei diferenciacijai. HL-60 ir NB4 ląstelės buvo veiktos 1 μM RA ir 0,2 μM belinostato nurodytą laiką. **(A)** Granulocitinė diferenciacija išreikšta kaip NBT teigiamų ląstelių procentas nuo bendro gyvų ląstelių skaičiaus arba **(B)** kaip santykinė dalis nuo RA paveiktų ląstelių. Rezultatai suvidurkinti, ±SN (n = 3); p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,001 (**) nurodo reikšmingą skirtumą nuo RA paveiktų ląstelių. **(C)** Reprezentatyvi ląstelės paviršinio žymens CD11b tėkmės citometrinė analizė po 48 val. kombinuoto poveikio. **(D)** *CEBPA* ir *CEBPE* geno raiškos įvertinimas AT-kPGR metodu. Rezultatai suvidurkinti, ±SN (n = 3), p ≤ 0,05 (*), p ≤ 0,001 (**) ir p ≤ 0,0001 (***) nurodo reikšmingus skirtumus nuo neveiktos kontrolės (Savickiene ir kt., 2014b).

4.2.3. Belinostato įtaka NB4 ląstelių genų ir baltymų raiškai

Yra žinoma, jog PML-RAR α chimerinis baltymas pritraukia korepresorių kompleksus (Sin3, Mi-2/NuRD ir CoREST), kuriuose kartu aptinkamos HDAC1 ir HDAC2. Taip pat parodyta, kad HDAC1 ir HDAC2 pasižymi onkogeniniu veikimu (apžv. Mehdipour ir kt. 2017). Siekėme išsiaiškinti, kokią įtaką HDACi belinostatas turi NB4 ląstelių HDAC1 ir HDAC2 genų raiškai bei baltymų kiekiui. Parodėme, jog po poveikių su 0,2 μ M Bel, 1 μ M RA ir jų kombinacija 0,2 μ M Bel + 1 μ M RA *HDAC1* geno raiška yra nuslopinama (4.2.3.1A pav.). Stipriausias ir greičiausias efektas (įvertinta po 6 val. inkubacijos) buvo pasiektas po poveikio vienu belinostatu. Prabėgus 24 val. *HDAC1* geno raiška dar buvo sumažėjusi, tačiau vėliau ji grįžo į pradinį lygį. Panašiai kaip ir *HDAC1*, taip ir *HDAC2* geno raiškos nuslopinimui didžiausią įtaką turėjo poveikis vienu Bel (4.2.3.1B pav.). Visgi tenka pažymėti, jog po ilgesnės inkubacijos su Bel *HDAC2* iRNR lygis atsistatė, skirtingai nei po poveikių RA ar Bel + RA (net ir po trijų parų *HDAC2* iRNR lygis liko sumažėjęs).

Norėdami patikrinti, ar Bel turi įtakos HAT, konkrečiai *PCAF* (angl.: *P300/CBP-associated factor*), genų raiškai, atlikome AT-kPGR tyrimą. Parodėme, jog belinostatas, veikdamas vienas, *PCAF* geno raiškos nepakeičia, skirtingai nei RA, kuri labai stipriai padidina *PCAF* transkripto kiekį (4.2.3.1C pav.). Visiškai priešingas efektas pastebėtas įvertinus junginių poveikį *CDKN1B* (koduojančio p27 baltymą) geno raiškai – Bel, palyginus su viena RA, gerokai stipriau padidino *CDKN1B* raišką (4.2.3.1D pav.). Be kita ko, parodėme, jog poveikis Bel taip pat padidina ir p27 baltymo kiekį (Savickiene ir kt., 2014b). Be to, *CDKN1B* geno raiškos padidėjimas po poveikio su Bel, bent dalinai, gali būti paaiškintas histono H4 hiperacetilavimo išaugimu *CDKN1B* geno promotorinėje srityje (Valiulienė ir kt., 2015).

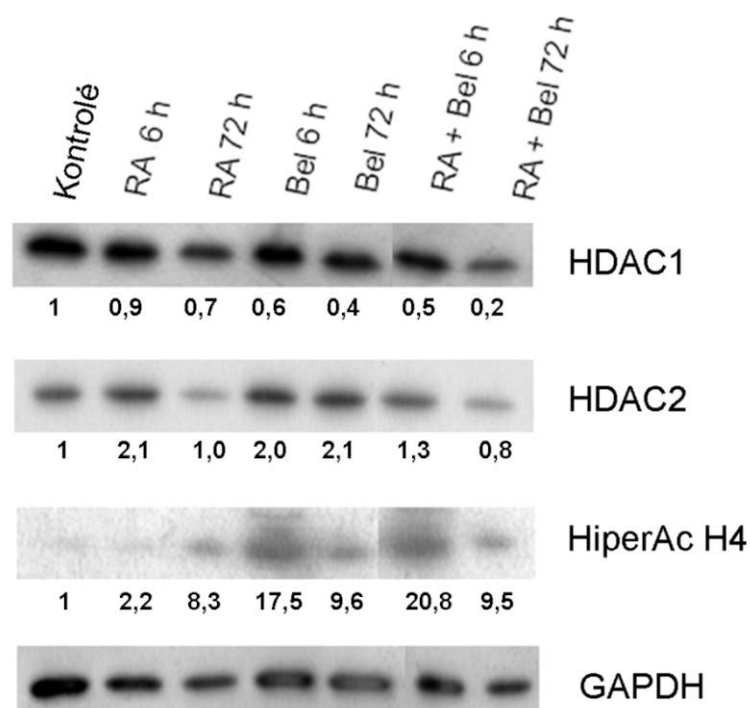


4.2.3.1 pav. Belinostato, RA ir jų kombinacijos įtaka NB4 ląstelių genų raiškai. (**A**, **B**, **C**, **D**) Kontrolinės NB4 ląstelės (K) ir NB4 ląstelės, paveiktos su 1 μ M RA (RA), 0,2 μ M belinostato (Bel) ir 1 μ M RA + 0,2 μ M belinostato (RA + Bel), kultivuotos nurodytą laiko tarpą (6–72 val.). *HDAC1* (**A**), *HDAC2* (**B**), *PCAF* (**C**) ir *CDKN1B* (**D**) genų raiškos pokyčiai įvertinti AT-kPGR metodu. Santykinis genų raiškos pokytis suvidurkintas (\pm SN, n = 3) (Valiuliene ir kt., 2015).

Norėdami išsiaiškinti belinostato poveikio molekulinis mechanizmus mes taip pat įvertinome ir 0,2 μ M belinostato įtaką (atskirai ir kartu su 1 μ M RA) histono H4 hiperacetilavimo lygiui bei HDAC1 ir HDAC2 baltymų lygio reguliavimui (4.2.3.2 pav.). Nustatėme, jog labiausiai NB4 ląstelių histono H4 hiperacetilavimo lygis išauga paveikus kombinacija 0,2 μ M Bel + 1 μ M RA. Histono H4 hiperacetilavimo padidėjimas buvo ankstyvas (registruota jau po 6 val. poveikio) ir intensyvus (palyginus su kontrole, išaugo 21 kartą). Po staigaus padidėjimo hiperacetilavimo lygis vėliau sumažėjo, tačiau net ir po 3 parų išliko apytiksliai 10 kartų didesnis nei kontrolėje (panašus histono H4 hiperacetilavimo lygis po 72 val. registruotas ir po poveikių viena RA ar belinostatu).

HDAC1 baltymo kiekio sumažėjimui didžiausią įtaką taip pat turėjo kombinacija Bel + RA. Jau po 6 val. poveikio HDAC1 baltymo kiekis,

palyginus su kontrolinėmis ląstelėmis, sumažėjo du kartus, o po 72 val. sumažėjimas jau siekė penkis kartus. Iš gautų duomenų matyti, jog RA, veikdama viena, HDAC1 baltymo kiekio pokyčiui didelės įtakos neturi, tačiau geba sustiprinti belinostato poveikį. Priešingai nei HDAC1, HDAC2 baltymo kiekis staiga išaugo po poveikių Bel, RA ir po poveikio kombinacija RA + Bel. Visgi po poveikių prabėgus 72 val., HDAC2 baltymo kiekis grįžo į pradinį lygį (išskyrus po poveikio belinostatu).



4.2.3.2 pav. Belinostato, RA ir jų kombinacijos įtaka NB4 ląstelių baltymų kiekio reguliavimui. NB4 ląstelės veiktos 1 μ M RA (RA), 0,2 μ M belinostato (Bel) ir 1 μ M RA + 0,2 μ M belinostato (RA + Bel) 6–72 val. Nurodytais laiko tarpais iš kontrolinių ir junginiais paveiktų ląstelių išskirtas bendras baltymas. Vienodi baltymų kiekiai išfrakcionuoti SDS/PAGE elektroforeze 7–15 % akrilamido gradientiniame gelyje, perkelti ant PVDF membranos ir toliau su mėginiais atlikta imunoanalizė. Gauti rezultatai nuskenuoti ir *ImageJ* programa įvertintas jų optinis tankis. Pateikti duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų, kurių metu buvo gauti panašūs rezultatai. Nurodytas santykinis pokytis lyginant su kontrole (Valiuliene ir kt., 2015).

4.2.4. Belinostato įtaka NB4 ląstelių baltymų kompleksų, besirišančių su hiperacetilintu histonu H4, sudėčiai

Siekėme išsiaiškinti, ar po poveikio belinostatu, padidėjus bendram hiperacetilinto histono H4 kiekiui, NB4 ląstelėse pakinta ir baltymų kompleksų, sąveikaujančių su šia epigenetine žyme, sudėtis. Tam pasitelkėme chromatino imunoišsodinimą kartu su hiperacetilintu histonu H4 ir išsodintų baltymų masių spektrometrijos tyrimą. Šie metodai padėjo mums sužinoti, kokie baltymai sąveikauja su hiperacetilintu histonu H4 kontrolinėse NB4 ląstelėse ir ląstelėse, paveiktose belinostatu. Kiekybiniai identifikuotų baltymų pokyčiai kontrolinėse ir belinostatu paveiktose ląstelėse nurodyti lentelėje 4.2.4.1 kaip K/Bel santykis (*K* – žymi, jog baltymas buvo aptiktas tik kontrolinėse ląstelėse, *Bel* – tik paveiktose ląstelėse).

Nustatyta, kad NB4 ląstelėse hiperacetilintas histonas H4 sąveikauja su 45 skirtingais baltymais (4.2.4.1 lentelė). Baltymų, kontrolinėse NB4 ląstelėse sąveikaujančių su hiperacetilintu histonu H4, sąveikų tinklas pateiktas 4.2.4.1 pav. Tik kontrolinėse ląstelėse hiperacetilintas histonas H4 sąveikauja su baltymais, kurie dalyvauja DNR replikacijoje (POLA2), transkripcijoje (GCOM1, POLR2M, NELFE, NCL), transliacijoje (RPL7) ir RNR karpyme (splaisinge) (SCNM1). Hiperacetilintas histonas H4 rastas taip pat sąveikaujantis su proonkogenu SPECC1, apoptozės reguliatoriumi ADAMTSL4 bei baltymais, dalyvaujančiais NF-kappaB, JAK2/STAT4, Ras ir Hedgehog signaliniuose keliuose. Hiperacetilintas histonas H4 NB4 ląstelėse taip pat sąveikauja su NPM1 (angl.: *Nucleophosmin*) baltymu, kuris reguliuoja auglio slopiklius TP53/p53 bei ARF. Paminėtina, jog NPM1 raiška būna padidėjusi aktyviai proliferuojančiose ląstelėse, pvz., vėžio ar kamieninėse ląstelėse (Lim ir Wang, 2006). NPM1 baltymas kompleksuose su hiperacetilintu histonu H4 aptiktas ir NB4 ląstelėse, paveiktose 2 μ M Bel. Visgi po poveikio šio baltymo aptikta beveik dukart mažiau nei kontrolinėse ląstelėse.

Po 6 val. poveikio su 2 μ M Bel (4.2.4.1 lentelė, 4.2.4.2 pav.), hiperacetilintas histonas H4 sąveikauja su proapoptoziniais baltymais ir

baltymais, reikalingais apoptoziniam atsakui (S100A9, S100A8, LGALS7, GOLGA3, PPT1). Vėžio slopiklis APC taip pat buvo aptiktas imunoišsodintuose kompleksuose. Svarbu paminėti, jog po poveikio su Bel hiperacetilintas histonas H4 sąveikauja ir su baltymais, kurie dalyvauja apsaugoje nuo oksidacinio streso (TXNRD2) bei baltymais, padedančiais retinoinei rūgščiai patekti prie branduolio retinoinės rūgšties receptorių (CRABP1).

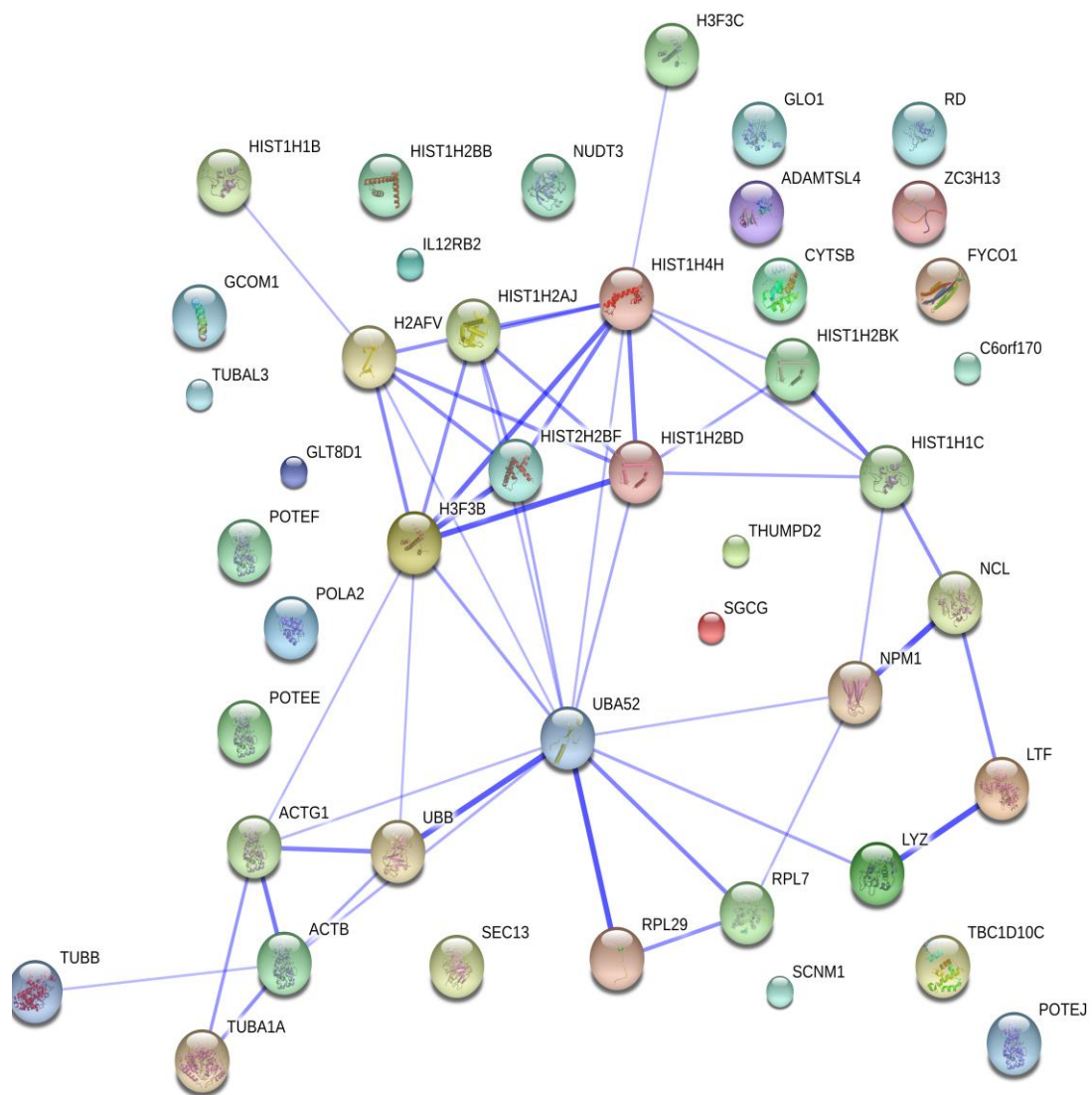
4.2.4.1 lentelė. Sąrašas NB4 ląstelių baltymų, sąveikaujančių su hiperacetilintu histonu H4 kontrolinėse ir Bel paveiktose ląstelėse (Valiuliene ir kt. 2015).

Nr. (1)	UniProtKB Nr. (2)	Geno pavadinimas (3)	Įvertis (4)	K/Bel santykis* (5)	Funkcija (6)
1	Q5QNW6	HIST1H2AH	9505,53	0,77105	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
2	Q99878	HIST1H2AJ	8305,59	0,59452	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
3	P33778	HIST1H2BB	42815,45	1	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
4	P58876	HIST1H2BD	10401,13	0,51171	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
5	P57053	HIST2H2BF	45639,36	Bel	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
6	P84243	H3F3A	10974,41	1,10517	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
7	Q6NXT2	H3F3C	828,6	0,69768	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
8	P62805	HIST1H4A	17505,7	0,84366	Viena iš pagrindinių nukleosomos sudedamųjų dalių.
9	P16401	HIST1H1B	615,33	1,1853	Nukleosomų kondensacija.
10	P16403	HIST1H1C	2448,72	1,05127	Nukleosomų kondensacija.
11	Q71UI9	H2AFV	5543,68	1,23368	Kai kuriose nukleosomose pakeičia įprastą H2A.
12	P57053	H2BFS	10401,13	0,5886	Kai kuriose nukleosomose pakeičia įprastą H2A.
13	P0C0S5	H2AFZ	7646,1	Bel	Kai kuriose nukleosomose pakeičia įprastą H2A.
14	Q14181	POLA2	152,92	K	DNR replikacija.
15	Q9BZD3	GCOM1	224,06	K	Pol II(G) komplekso sudėtinė dalis.
16	P0CAP2	POLR2M	284,39	K	Pol II(G) komplekso sudėtinė dalis.
17	P18615	NELFE	266,18	K	Nuslopina RNR polimerazės II transkripto elongaciją.
18	P51504	ZNF80	444,63	Bel	Genų raiškos reguliavimas.
19	P18124	RPL7	235,63	K	Transliacijos aparato reguliavimas.
20	P47914	RPL29	622,4	0,92312	Transliacijos aparato reguliavimas.
21	Q9BWG6	SCNM1	620,47	K	RNR karpymas (splaisingas).
22	Q8WXA9	SREK1	148,46	Bel	Alternatyvaus karpymo (splaisingo) reguliavimas.
23	P19338	NCL	132,66	K	Pirminės RNR (pre-rRNR) raiška ir ribosomos susirinkimas.
24	P02788	LTF	275,73	K	Antimikrobinis ir priešuždegiminis aktyvumas.
25	P61626	LYZ	751,9	3,56085	Bakterijų lizė.
26	P06702	S100A9	2362,67	Bel	Antimikrobinis aktyvumas. Fagocitų migravimo skatinimas. Apoptozė.

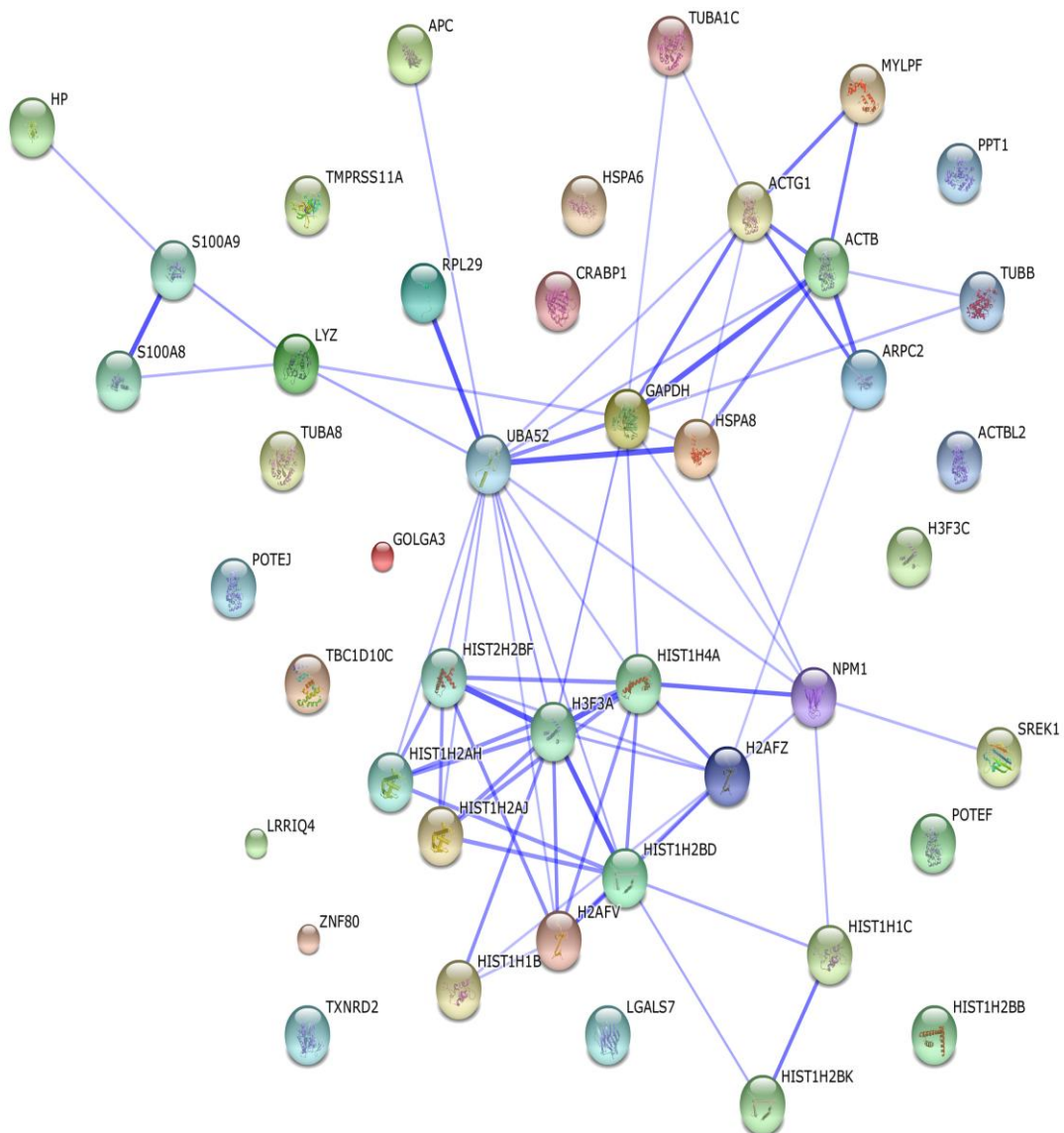
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
27	P05109	S100A8	1869,7	Bel	Antimikrobinis aktyvumas. Fagocitų migravimo skatinimas. Apoptozė.
28	P60709	ACTB	3806,68	1,82212	Laštelių judėjimas.
29	P63261	ACTG1	1713,96	0,34301	Laštelių judėjimas.
30	Q562R1	ACTBL2	664,65	Bel	Laštelių judėjimas.
31	A6NHL2	TUBAL3	110,36	K	Mikrovamzdelių sudedamoji dalis.
32	Q71U36	TUBA1A	452,48	K	Mikrovamzdelių sudedamoji dalis.
33	P07437	TUBB	620,75	2,2034	Mikrovamzdelių sudedamoji dalis.
34	Q9BQS8	FYCO1	61,54	K	Dalyvauja pūslelių pernašoje link mikrovamzdelių + galo.
35	Q13326	SGCG	315,83	K	Sarkoglikanų komplekso sudedamoji dalis.
36	Q9NY65	TUBA8	123,57	Bel	Mikrovamzdelių sudedamoji dalis.
37	Q9BQE3	TUBA1C	54,26	Bel	Mikrovamzdelių sudedamoji dalis.
38	O15144	ARPC2	666,79	Bel	Aktino polimerizacijos reguliavimas.
39	Q96A32	MYLPF	737,84	Bel	Miozino lengvoji grandinė.
40	Q6UY14	ADAMTSL4	247,27	K	Teigiamas apoptozės reguliavimas.
41	P47929	LGALS7	392,7	Bel	Apoptozės reguliavimas. Pro-apoptozinis veikimas.
42	Q08378	GOLGA3	7,44	Bel	Goldžio aparato struktūros palaikymas. Skilimo produktai reikalingi apoptoziniam atsakui.
43	P50897	PPT1	124,76	Bel	Lizosominis degradavimas. DNR fragmentacija apoptozės metu.
44	Q5M775	SPECC1	380,22	K	Proto-onkogenas.
45	P25054	APC	30,36	Bel	Auglio slopiklis.
46	Q04760	GLO1	253,31	K	Dalyvauja reguliuojant TNF indukuoto NF-kB geno raiškos aktyvumą.
47	Q5T200	ZC3H13	22,03	K	NF-kB kelio slopinimas.
48	O95989	NUDT3	215,22	K	Signalų perdavimas. Neigiamas ERK1/2 kelio reguliavimas.
49	Q99665	IL12RB2	269,83	K	Signalinė molekulė, dalyvaujanti JAK2/STAT4 kelyje. Skatina T ir NK laštelių proliferaciją.
50	Q8IV04	TBC1D10C	834,75	0,8781	Ras signalinio kelio slopinimas.
51	Q96NH3	C6orf170	1777,55	K	Kontroliuoja žiuželių morfologiją. Dalyvauja Hedgehog signalo perdavime.
52	P06748	NPM1	612,64	1,85893	Reguliuoja auglio slopiklius TP53/p53 ir ARF. Šaperonas.
53	Q9NNW7	TXNRD2	158,36	Bel	Dalyvauja apsaugoje nuo oksidacinio streso.
54	P29762	CRABP1	133,35	Bel	Reguliuoja retinoinės rūgšties patekimą prie branduolio retinoinės rūgšties receptorių.
55	P17066	HSPA6	121,58	Bel	Šaperonas.
56	P48741	HSPA7	78,01	Bel	Šaperonas.
57	P11142	HSPA8	144,69	Bel	Genų raiškos aktyvavimo slopiklis.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
58	P55735	SEC13	122	K	Dalyvauja baltymų transporte.
59	P62987	UBA52	755,27	0,77105	Proteosominė degradacija, chromatino struktūros palaikymas, genų raiškos reguliavimas ir atsakas į stresą.
60	P0CG47	UBB	241,72	K	Proteosominė degradacija, chromatino struktūros palaikymas, genų raiškos reguliavimas ir atsakas į stresą.
61	Q6ZMR5	TMPRSS11A	860,74	Bel	Galimai serino proteazė.
62	P00738	HP	1190,67	Bel	Padaro hemoglobina pasiekiamą skaldantiems fermentams.
63	Q6S8J3	POTEE	346,61	K	Prisijungimas prie baltymų ir ATP.
64	A5A3E0	POTEF	369,2	2,13828	Prisijungimas prie baltymų ir ATP.
65	P0CG39	POTEJ	107,66	1,46228	Prisijungimas prie baltymų ir ATP.
66	Q9BTF0	THUMPD2	238,14	K	Prisijungimas prie RNR. Metiltransferazinis aktyvumas.
67	Q68CQ7	GLT8D1	206,26	K	Glikoziltransferazė.
68	A6NIV6	LRRIQ4	145,7	Bel	Turi leucinu turtingų pasikartojimų ir IQ motyvą.

* **K** reiškia, jog baltymas aptinkamas tik kontrolėje. **Bel** – aptinkamas tik paveiktose ląstelėse.



4.2.4.1 pav. Kontrolinių (nepaveiktų) NB4 ląstelių baltymai, sąveikaujantys su hiperacetilintu histonu H4. Nepaveiktų NB4 ląstelių mėginiai paruošti tolimesniam chromatino imunoišodinimo ir masių spektrometrijos tyrimui. Identifikuotų baltymų sąsajų žemėlapis pateiktas naudojant STRING duomenų bazę (<http://string.embl.de>) (Valiuliene ir kt., 2015).



4.2.4.2 pav. Belinostatu paveiktų NB4 ląstelių baltymai, sąveikaujantys su hiperacetilintu histonu H4. 2 μ M Bel paveiktų NB4 ląstelių mėginiai paruošti tolimesniam chromatinio imunoišsodinimo ir masių spektrometrijos tyrimui. Identifikuotų baltymų sąsajų žemėlapis pateiktas naudojant STRING duomenų bazę (<http://string.embl.de>) (Valiuliene ir kt., 2015).

4.2.5. Rezultatų aptarimas

Šio tyrimo metu mes parodėme, jog belinostatas, priklausomai nuo koncentracijos (0,2–2 μ M), nuslopina NB4 ir HL-60 ląstelių linijų proliferaciją ir indukuoja jų apoptozę (4.2.1.1 pav. ir 4.2.1.2 pav.). Ankstesni tyrimai (Stapnes ir kt., 2007) pademonstravo panašų, priklausomą nuo koncentracijos, HDAC slopiklių (tarp jų ir belinostato) poveikį pirminėms ŪML ląstelėms, išskirtoms iš pacientų kraujo. Reikia paminėti, jog didelės vaistų dozės pasižymėjo proliferaciją stabdančiu ir proapoptoziniu poveikiu, o mažos ar vidutinio dydžio dozės (pvz., kai naudota 5–80 nM belinostato), priešingai – arba visiškai nestabdė ląstelių dauginimosi, arba netgi jį skatino. Mūsų tyrimai parodė, kad 0,2–0,5 μ M belinostato blokuoja ląstelių ciklą G0/G1 ciklo fazėje, o didesnės belinostato dozės (1–2 μ M) blokuoja ląstelių ciklą S fazėje (4.2.1.1C pav.). Kadangi dėl belinostato poveikio stipriai išauga histonų acetilinimas (4.2.3.2 pav.), tai galimai sutrikdo ir chromosomų kondensacijos procesus, dėl ko atitinkamai ląstelės gali toliau būti nukreiptos apoptozinės žūties keliu (Castedo ir kt., 2004). Mūsų atliktas tyrimas (Savickiene ir kt., 2014b) parodė, kad ląstelės žudančios belinostato koncentracijos taip pat aktyvavo kaspazę-3 ir indukavo PARP-1 sukarpymą, kas yra būdinga vidiniam (mitochondriniam) apoptozės keliui.

Įvertinome ir belinostato gebėjimą sustiprinti RA indukuotą ŪPL ląstelių granulocitinę diferenciaciją. Parodėme, jog veikdamas kartu su RA, belinostatas po 24–48 val. poveikio padidino RA indukuotą diferenciaciją 1,5–1,8 karto (4.2.2.1B pav.). Reikia pažymėti, jog kombinacija Bel + RA stipriau sužadino NB4 ir HL-60 ląstelių granulocitinę diferenciaciją nei poveikis Bix + RA (4.1.2.1A–B). Visgi svarbu paminėti, kad belinostato sukeltas granulocitinės diferenciacijos sustiprinimas yra panašaus dydžio kaip ir kitų epigenetinei leukemijos terapijai naudojamų HDACi. Mūsų grupė anksčiau parodė, kad poveikiai HDACi fenilbutiratu, BML-210 ar FK228 taip pat labai panašiai sustiprina RA indukuotą granulocitinę diferenciaciją (Savickiene ir kt., 2006a; Savickiene ir kt., 2006b; Savickiene ir kt., 2012).

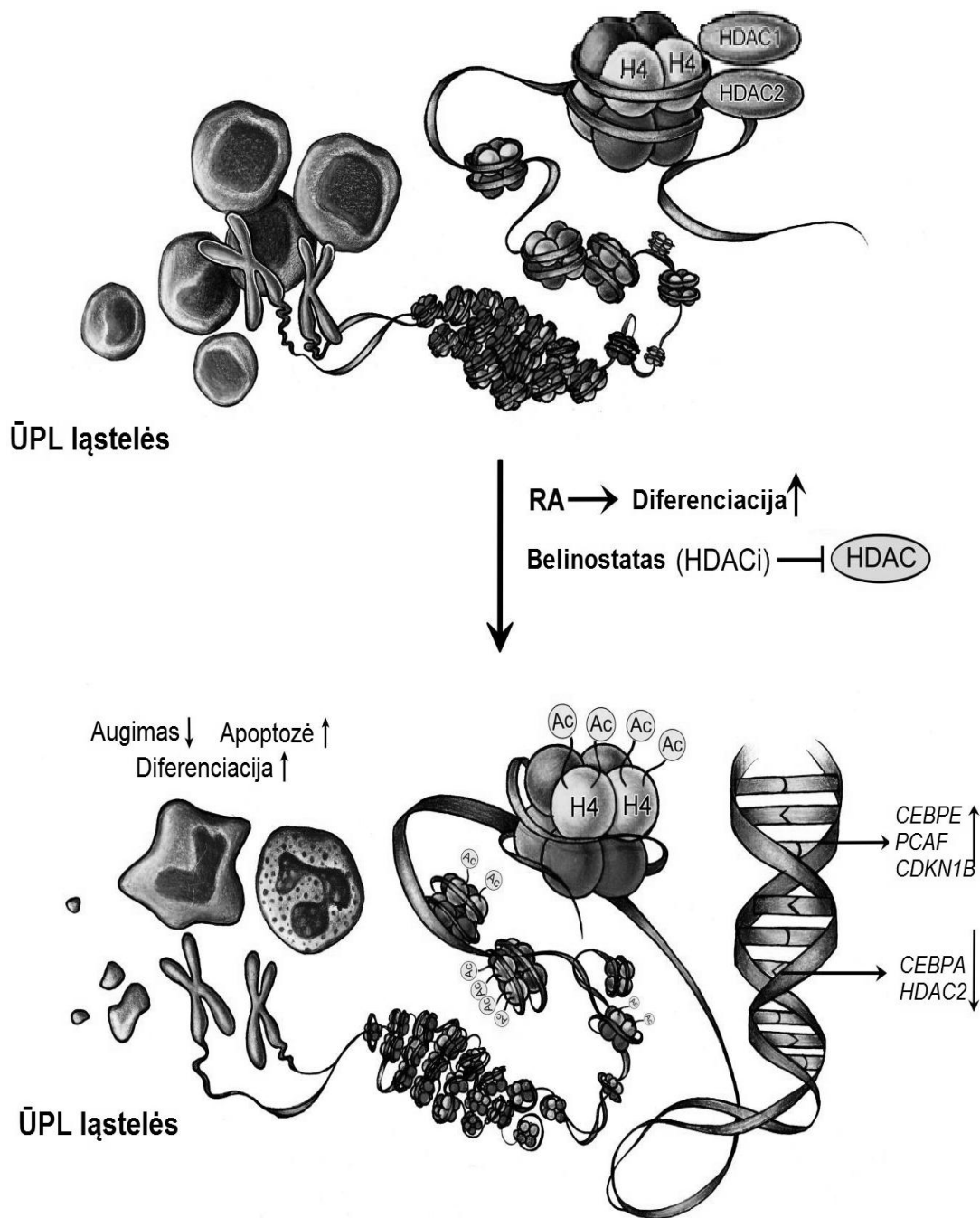
Histonų acetilinimo sustiprėjimas – vienas pagrindinių įverčių, leidžiančių nustatyti HDACi poveikio efektyvumą. Kaip žinia, histonų acetilinimas sukuria palankią terpę genų raiškos aktyvavimui, o histonų deacetilinimas, priešingai, – veda prie genų raiškos nutildymo (Verdone ir kt., 2005). Taip pat parodyta, kad ŪPL ląstelėms diferencijuojant į granulocitus išauga ir histono H4 acetilinimo lygis (Nouzova ir kt., 2004). Kalbant apie belinostato įtaką epigenetinių moduliatorių raiškai, parodėme, jog po poveikio belinostatu NB4 ląstelėse stipriai sumažėja *HDAC1* ir *HDAC2* genų raiška (4.2.3.1A–B pav.). Pastebėjome, kad belinostatas taip pat ženkliai sumažina *HDAC1* baltymo lygį ir gerokai sustiprina histono H4 acetilinimą (4.2.3.2 pav.). Mūsų tyrimai taip pat parodė, jog poveikis belinostatu sužadina ir H3K9 acetilinimą (Savickiene ir kt., 2014b). Ankstesni kitų grupių tyrimai (Fraga ir kt., 2005; Wada ir kt., 2009) atskleidė, kad ŪML ląstelėse HDAC baltymų, ypač *HDAC1*, raiška yra labai išaugusi, dėl ko histonai tampa hipoacetilinti. Parodyta ir tai, jog granulocitinės leukemijos ląstelių diferenciacijos metu *HDAC1* baltymo raiška nuslopinama ir yra atkuriamas įprastinis, būdingas sveikam fenotipui, acetilinimas. Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai sutampa ir su kitų grupių publikuotais duomenimis. Pažymėtina, kad HDAC genų ir baltymų raiškos rezultatai po poveikio belinostatu patvirtina šios epigenetinės terapijos veiksmingumą.

Tyrėme belinostato poveikį ne tik HDAC fermentams, tačiau ir įtaką HAT, konkrečiai PCAF. Kaip žinia, PCAF atlieka acetilazės funkciją, šis baltymas geba tiesiogiai modifikuoti histonus bei kitus baltymus. Be to, PCAF sąveikauja ir su papildomais aktyvatoriais, tokiais kaip CBP/p300, ACTR (Chen ir kt., 1997), bei transkribuojamose srityse geba padidinti histonų acetilinimą (daugiausia histonų H3 ir H4) (Bannister ir Kouzarides, 1996). Anksčiau buvo pademonstruota (Zhang ir kt., 2010), kad P19 karcinomos ląstelėse RA indukuoja PCAF geno raišką ir baltymo kiekio padidėjimą ląstelių branduoliuose. Taip pat yra manoma, jog PCAF ir pats yra reikalingas nuo retinoidų priklausomai genų raiškai aktyvuoti (Blanco ir kt., 1998). Mūsų tyrimai patvirtino (Valiuliene ir kt., 2015), jog NB4 ląstelėse RA iš tiesų

sužadina PCAF geno raišką (4.2.3.2 pav.). Visgi taip pat pastebėjome, kad 6 val. poveikis belinostatu PCAF geno raišką sumažino daugiau nei perpus (lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis), nors vėliau PCAF geno raiška ir grįžta į pradinį lygį. Reikėtų pažymėti, jog po poveikio belinostatu pastebėtas ir nuo koncentracijos priklausomas PCAF baltymo kiekio sumažėjimas (Savickiene ir kt., 2014b). Iš aptartų duomenų matyti, kad belinostatas ŪPL ląstelėse iš tiesų geba moduluoti histonų acetilinimo procesus bei turi įtakos pačių histonus acetilinančių ar deacetilinančių fermentų raiškai. Apibendrinti belinostato poveikio tyrimų rezultatai pateikti 4.2.5.1 pav.

Įdomūs rezultatai gauti atlikus NB4 ląstelių su hiperacetilintu histonu H4 sąveikaujančių baltymų masių spektrometrinę analizę (4.2.4.1 lentelė, 4.2.4.1 pav. ir 4.2.4.2 pav.). Parodėme, jog po 6 val. poveikio su 2 μ M belinostato koncentracija, lyginant su kontrole, imunoišsodintuose baltymų kompleksuose su hiperacetilintu histonu H4 kartu nebeaptinkama baltymų, dalyvaujančių genų transkripcijos ar translacijos procesuose. Šiuo atveju, hiperacetilintas histonas H4 rastas kompleksuose su NET (angl.: *neutrophil extracellular traps*) baltymais, kurie paprastai yra aptinkami citozolinėje frakcijoje. Parodyta, kad į NET kompleksų sudėtį įeina DNR, modifikuoti histonai (citrulininti, hiperacetilinti) bei antimikrobiniai baltymai. Visa tai sudaro savotišką ekstraląstelinį tinklą, gebantį pagauti patogenus ir juos nukenksminti (Wartha ir kt., 2007; Pieterse ir kt., 2015). Žinoma, jog NET sekretuojami į ekstraląstelinę erdvę, kai ląstelių žūtį indukuoja NADPH oksidazės komplekso pagamintos aktyvios deguonies formos (ROS) (Fuchs ir kt., 2007).

Kalbant apie NET kompleksų sudėtį, parodyta, kad juose yra randamas kalprotektinas (S100A8/S100A9) (Urban ir kt., 2009), baltymų kompleksas, sudarytas iš dviejų kalcį prijungiančių baltymų. Šie baltymai yra gausiai aptinkami neutrofilų citozolinėje frakcijoje ir yra žinoma, jog jie geba indukuoti apoptozės vyksmus (Yui ir kt., 2003). NB4 ląsteles paveikus belinostatu hiperacetilintas histonas H4 iš tiesų rastas susijęs ir su kalprotektinu (tiek S100A8, tiek ir S100A9). Kaip žinia, kalprotektinas yra būtinas neutrofilų



4.2.5.1 pav. Epigenetinės terapijos, naudojant belinostatą kartu su RA, poveikio ŪPL ląstelėms (NB4 ir HL-60) apibendrinta iliustracija. Kaip parodyta, kombinacija Bel+RA sustabdė ŪPL ląstelių augimą. Be to, ši cheminių junginių kombinacija sustiprino RA indukuotą leukemijos ląstelių granulocitinę diferenciaciją ir toliau vedė ląsteles apoptozinės žūties link. Po poveikių Bel+RA išaugo *CEBPE*, *PCAF*, *CDKN1B* bei sumažėjo *CEBPA* ir *HDAC2* genų raiška. Pastebėtas ir HDAC1 bei HDAC2 baltymų kiekio sumažėjimas, dėl ko atitinkamai išaugo ir histono H4 acetilavimo lygis (modifikuota pagal Valiulienė ir kt., 2017).

NADPH oksidazės aktyvavimui (Brechard ir kt., 2013) – parodyta, jog užblokavus S100A9 raišką sutrikdomas ir NADPH aktyvumas (Kerkhoff ir kt. 2005). Reikėtų pažymėti, jog poveikis belinostatu sužadina aktyvių deguonies formų gamybą, tai parodyta kasos karcinomos ląstelėse PANC-1 (Wang ir kt., 2013). Panašūs rezultatai gauti ir daugybinės mielomos ląstelėse (Feng ir kt., 2007).

Be kalprotektino, po poveikio belinostatu baltymų kompleksuose su hiperacetilintu histonu H4 rasta ir serino proteazė TMPRSS11A. Šie rezultatai iš tiesų dera su anksčiau aptartais duomenimis, rodančiais, kad NET sudėtyje būna ir serino proteazių – pastarosios šiose struktūrose atlieka antimikrobinę funkciją (Papayannopoulos ir kt., 2010). Apibendrinus būtų galima pasakyti, jog belinostato indukuotas leukemijos ląstelių žudymas galimai siejasi ir su NET susiformavimu. Nors ir yra žinoma, kad mieloidinėse ląstelėse belinostatas indukuoja apoptozę (Stapnes ir kt., 2007; Dai ir kt., 2011; Savickiene ir kt., 2014b), ne NETozę (atskira ląstelių žūtis forma, kuriai vykstant į ekstraląstelinę erdvę išmetami NET, pirmą kartą aprašyta Steinberg ir kt. (2007)), visgi neatmestina ir tai, jog belinostatas, per ROS gamybos aktyvavimą, skatina ir NET formavimąsi. Tyrimais nustatyta, kad ŪML ląstelės, nepriklausomai nuo jų diferenciacijos stadijos, gali pagaminti tik labai mažą NET kiekį (Steinberg ir kt., 2007). Be to, neseniai parodyta, kad NET formavimasis nebūtinai veda ląstelių žūtis link (Yousefi ir kt., 2009; Yipp ir kt., 2012). Yra žinoma, jog ląstelės, suformavusios NET, išlaiko gebėjimą žūti ir apoptozės keliu (Darrah ir Andrade, 2013). Be to, pastaruoju metu pasirodė duomenų (apžv. König ir Andrade, 2016), iliustruojančių, jog daugeliu atveju, NEToze klaidingai įvardinti ir kiti ląstelės pažaidų procesai ar mirties formos (pvz., nekrotozė). Kaip bebūtų, iš mūsų turimų duomenų galima tik nuspėti, jog poveikis belinostatu ŪML ląstelėse indukuoja NET ar į jas panašių struktūrų formavimąsi. Šiai hipotezei patvirtinti arba atmesti būtų reikalingi tolimesni išsamūs tyrimai.

Apibendrinus, mūsų darbo rezultatai parodė, jog belinostatas yra potencialiai vertingas ir ŪPL epigenetinėje terapijoje galimai pritaikomas

cheminis junginys. Dėl to atlikome ir belinostato bei HMT slopiklio 3-deazaneplanocino A (DZNep) kombinacijos su RA įtakos ŪPL ląstelėms tyrimą. Kombinuotam poveikiui su belinostatu pasirinktas 3-deazaneplanocinas A, nes žinoma, jog šis HMT slopiklis *in vitro* nuslopina PRC2 komplekso katalitinio subvieneto EZH2 baltymo raišką (Girard ir kt., 2014). EZH2 raiškos nuslopinimas, savo ruožtu, sinergetiškai sustiprina HDAC slopiklių priešvėžinį aktyvumą (Takashina ir kt., 2016).

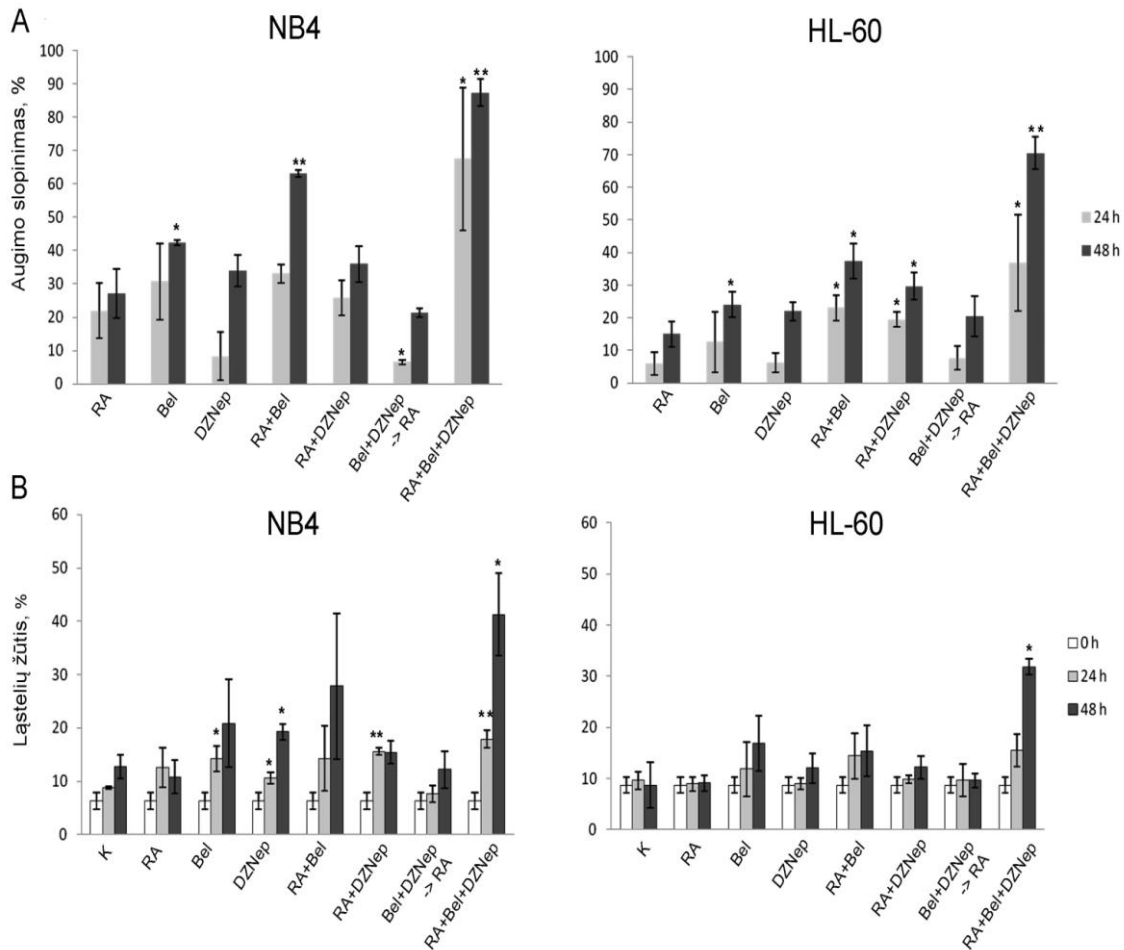
4.3. HDACi belinostato ir HMTi DZNep įtaka žmogaus ŪPL ląstelėms

4.3.1. Belinostato ir DZNep įtaka ląstelių augimui ir išgyvenamumui

Įvertinome belinostato ir 3-deazaneplanocino A poveikį ląstelių augimui ir žūčiai. NB4 ir HL-60 ląstelės dvi paras buvo veiktos 0,2 μM belinostato (Bel), 0,5 μM 3-deazaneplanocino A (DZNep), atskirai ar kartu su 1 μM RA (Bel + RA, DZNep + RA, Bel + DZNep + RA). Taip pat naudota ir kombinacija, kuomet ląstelės 0,8 μM Bel ir 0,2 μM DZNep paveiktos 4 val., ląstelės vėliau nuplautos ir toliau kultivuotos terpėje su 1 μM RA (Bel + DZNep → RA).

Darbo metu parodėme, kad kombinuotas pirminis poveikis belinostatu ir DZNep prieš paveikiant RA (Bel + DZNep → RA) nepasižymėjo stipresniu augimą slopinančiu aktyvumu nei poveikis viena RA (4.3.1.1A pav.) (Valiulienė ir kt., 2017). Kalbant apie ląstelių žūties indukavimą, tiek kombinuotas poveikis su nuplovimu, tiek poveikis atskirai viena RA stipriu žudančiu veikimu nepasižymėjo (4.3.1.1B pav.). Akivaizdžiausiai NB4 ir HL-60 ląstelių augimą nuslopino kombinuotas poveikis Bel + DZNep + RA (4.3.1.1A pav.). Po 48 val. poveikio augimo slopinimas NB4 ir HL-60 ląstelėse atitinkamai siekė 87 % ir 70 %. Panašūs dėsningumai pastebėti įvertinus ir ląstelių žūtį (4.3.1.1B pav.). Stipriausiai ląsteles žudė poveikis su kombinacija

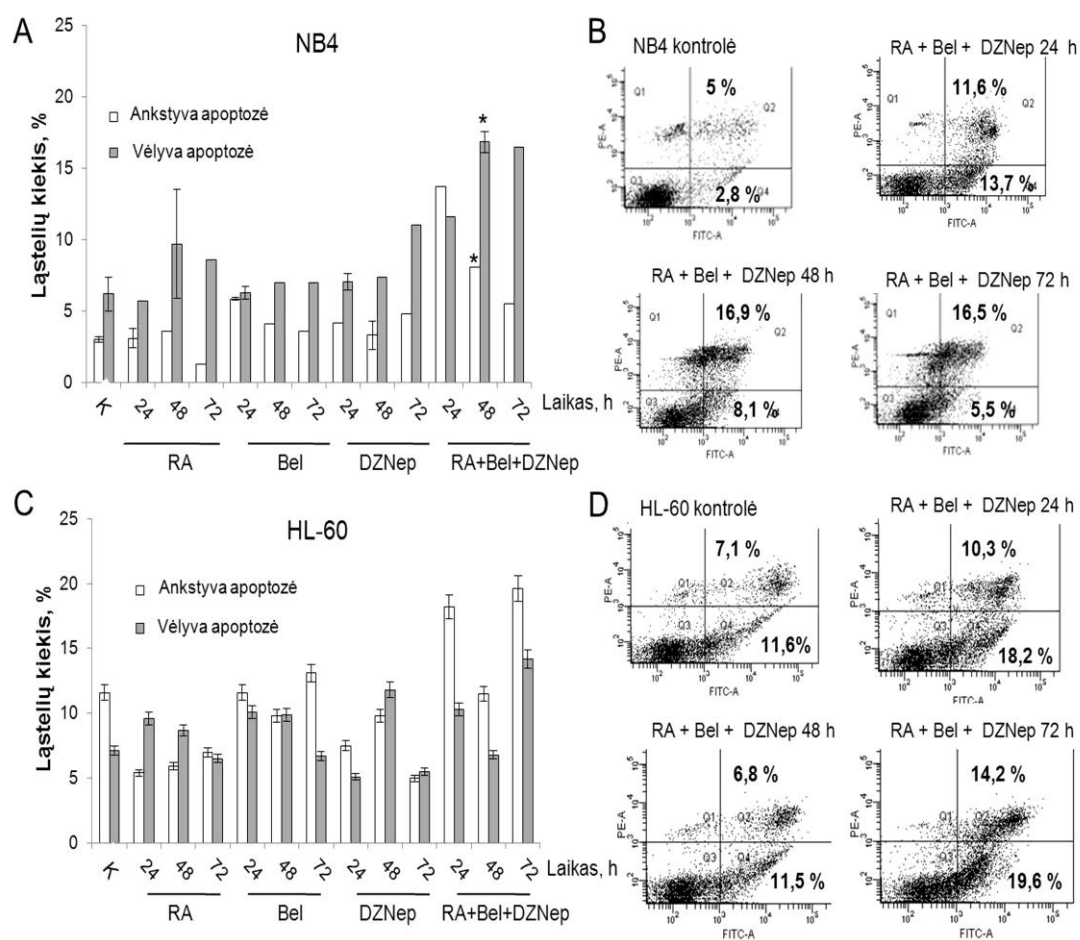
RA + Bel + DZNep. Po 48 val. kombinuoto poveikio ląstelių žūtis (palyginus su kontrole) NB4 kultūroje išaugo 28 %, o HL-60 – 22 %.



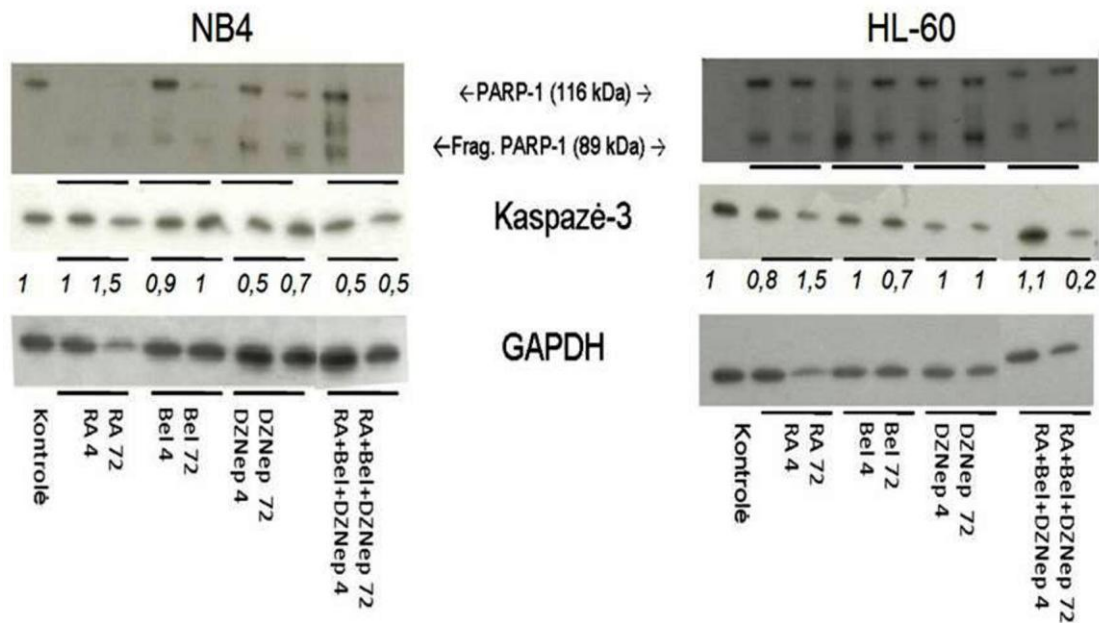
4.3.1.1 pav. Leukemijos ląstelių augimo slopinimas ir žūtis. 24 ir 48 val. 1 μM RA, 0,2 μM Bel, 0,5 μM DZNep, 1 μM RA + 0,2 μM Bel, 1 μM RA + 0,5 μM DZNep, 0,2 μM Bel + 0,5 μM DZNep + 1 μM RA ir 0,8 μM Bel + 0,5 μM DZNep (4 h) → 1 μM RA paveiktų NB4 ir HL-60 ląstelių augimo slopinimas (A) ir ląstelių žūtis (B). Gyvų ir žuvusių ląstelių kiekis nustatytas ląsteles nudažius 0,2 % tripano mėliu ir nusidažiusių ląstelių skaičių įvertinus hematocitometru. Ląstelių augimo slopinimas nustatytas pagal formulę, nurodytą skyriaus „Medžiagos ir tyrimo metodai“ poskyryje „3.4. Metodai“. Ląstelių žūtis išreikšta procentu nuo bendro ląstelių skaičiaus. Įvertintas skirtumų reikšmingumas tarp ląstelių, paveiktų RA ir belinostatu, DZNep ar pastarųjų ir RA kombinacija (A) arba tarp kontrolinių ląstelių ir ląstelių, paveiktų nurodytais junginiais (B). Rezultatai suvidurkinti, $\pm\text{SN}$ (n = 3); $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) (Valiulienė ir kt., 2017).

Aneksino-PJ testu nustatėme, jog poveikis 1 μM RA + 0,2 μM Bel + 0,5 μM DZNep stipriausiai indukuoja ŪPL ląstelių apoptozę (4.3.1.2A,C pav.). Ryškiausias efektas pastebėtas NB4 ląstelėse. Atlikome baltymų, susijusių su

apoptozės procesais, PARP-1 ir kaspazės-3, imuninę analizę (4.3.1.3 pav.). Baltymų imuninę analizę parodė, jog po poveikių NB4 ir HL-60 ląstelėse PARP-1 yra fragmentuojamas. Sukarpymas ryškesnis po 4 val. poveikio 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep ir 1 μ M RA + 0,2 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep negu po 72 val. poveikio. PARP-1 sukarpymo neaptikta kontrolinėse NB4 ląstelėse ir ląstelėse, paveiktose vien tik RA.



4.3.1.2 pav. ŪPL ląstelių apoptozės įvertinimas. (A, C) Tėkmės citometriniis ankstyvos ir vėlyvos apoptozės tyrimas NB4 (A) ir HL-60 (C) ląstelės nudažius Aneksinu V-FITC ir PJ. Ląstelės nurodytą laiką veiktos 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep ir 1 μ M RA + 0,2 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep. Ląstelių kiekis ankstyvoje ir vėlyvoje apoptozės stadijoje išreikštas procentais nuo bendro ląstelių skaičiaus. Pateikti duomenys suvidurkinti, \pm SN, (n = 3). (B, D) NB4 ir HL-60 ląstelių tėkmės citometrijos diagramos. Q1 – nekrotuotos ląstelės, Q2 – vėlyva apoptozė, Q3 – gyvybingos ląstelės, Q4 – ankstyva apoptozė. Pateikti duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų, kurių metu buvo gauti panašūs rezultatai (Valiulienė ir kt., 2017).



4.3.1.3 pav. PARP-1 sukarpymo ir kaspazės-3 baltymo kiekio pokyčiai ŪPL ląstelėse. (A–B) PARP-1 sukarpymo ir kaspazės-3 baltymo kiekio pokyčiai NB4 (A) ir HL-60 (B) ląstelėse po 4–72 val. poveikių 1 μM RA, 0,2 μM Bel, 0,5 μM DZNep ir 1 μM RA + 0,2 μM Bel + 0,5 μM DZNep. Kaip baltymų kiekio kontrolė naudotas GAPDH. *ImageJ* programa įvertintas optinis blotų tankis. Pateikti duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų, kurių metu buvo gauti panašūs rezultatai. Kaspazei-3 nurodytas santykinis pokytis lyginant su kontrole (Valiulienė ir kt., 2017).

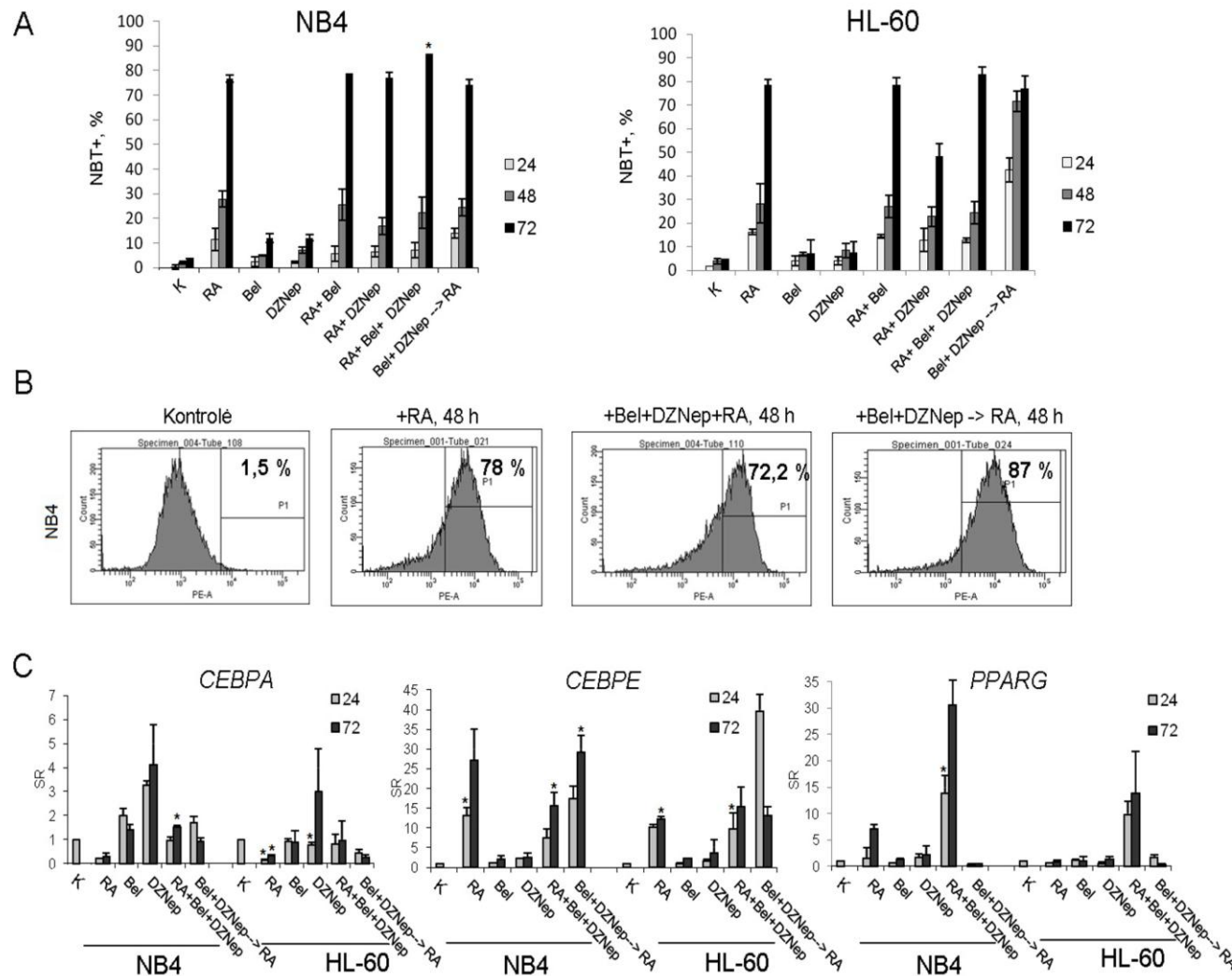
4.3.2. Belinostato ir DZNep įtaka RA indukuotai ląstelių diferenciacijai

Granulocitinė ŪPL ląstelių diferenciacija įvertinta NBT testu. Parodėme, jog tiek NB4, tiek HL-60 ląstelių granulocitinę diferenciaciją efektyviausiai indukuoja poveikis 0,8 μM Bel + 0,5 μM DZNep + 1 μM RA (4.3.2.1A pav.). Po šio poveikio prabėgus 72 val. ląstelių diferenciacija atitinkamai siekė 86 % ir 83 %. Panašūs rezultatai gauti ir po poveikių RA ir Bel + DZNep \rightarrow RA. CD11b paviršinio ląstelių žymens tyrimas taip pat patvirtino NBT testo rezultatus: Bel + DZNep \rightarrow RA po 48 val. poveikio padidino RA indukuotą diferenciaciją 10 % (4.3.2.1B pav.).

Įvertinome ir RA, belinostato, DZNep bei jų kombinacijų įtaką su diferenciacija susijusių transkripcijos veiksnių PPAR γ , C/EBP ϵ ir C/EBP α genų raiškai (4.3.2.1C pav.). Mūsų tyrimas patvirtino, jog leukemijos ląstelėms diferencijuojant į granulocitus *CEBPA* raiška nuslopsta. *CEBPA* geno raišką

stipriausiai nuslopino poveikis 1 μ M RA – po 72 val. NB4 ląstelėse šio geno raiška sumažėjo 72 %, o HL-60 ląstelėse atitinkamai 67 %. Įdomu, jog, ląsteles paskirai paveikus vienu belinostatu arba DZNep, *CEBPA* geno raiška išaugo. Taip pat parodėme, kad, leukemijos ląstelėms diferencijuojant, *CEBPE* geno raiška ženkliai padidėja. Poveikis Bel + DZNep \rightarrow RA stipriausiai padidino *CEBPE* iRNR lygį HL-60 ląstelėse (po 24 val. apytiksliai 40 kartų). NB4 ląstelėse efektas buvo silpnesnis – po 72 val. *CEBPE* geno raiška išaugo 29 kartus. Reikėtų pažymėti, jog belinostatas ir DZNep, kaip atskiri cheminiai junginiai, *CEBPE* raiškos stipriai nepadidino.

Taip pat įvertinome ir naudotų junginių įtaką *PPARG* geno raiškai. Šio geno veikla siejama su ląstelių diferenciacija ir apoptoze (Yasugi ir kt., 2006). Parodėme, jog, leukemijos ląstelėms diferencijuojant į granulocitus, *PPARG* raiška išauga. Po 72 val. poveikio viena RA NB4 ląstelėse *PPARG* iRNR kiekis padidėjo 7 kartus, o po kombinuoto poveikio Bel + DZNep \rightarrow RA *PPARG* geno raiškos padidėjimas buvo akivaizdus abiejose ląstelių linijose: NB4 ląstelėse išaugo 31 kartą, HL-60 ląstelėse – per pusę tiek. Priešingi rezultatai gauti po poveikio Bel + DZNep + RA: NB4 ląstelėse užfiksuota, jog *PPARG* geno raiška sumažėjo 30 kartų, o HL-60 ląstelėse apie 13 kartų.

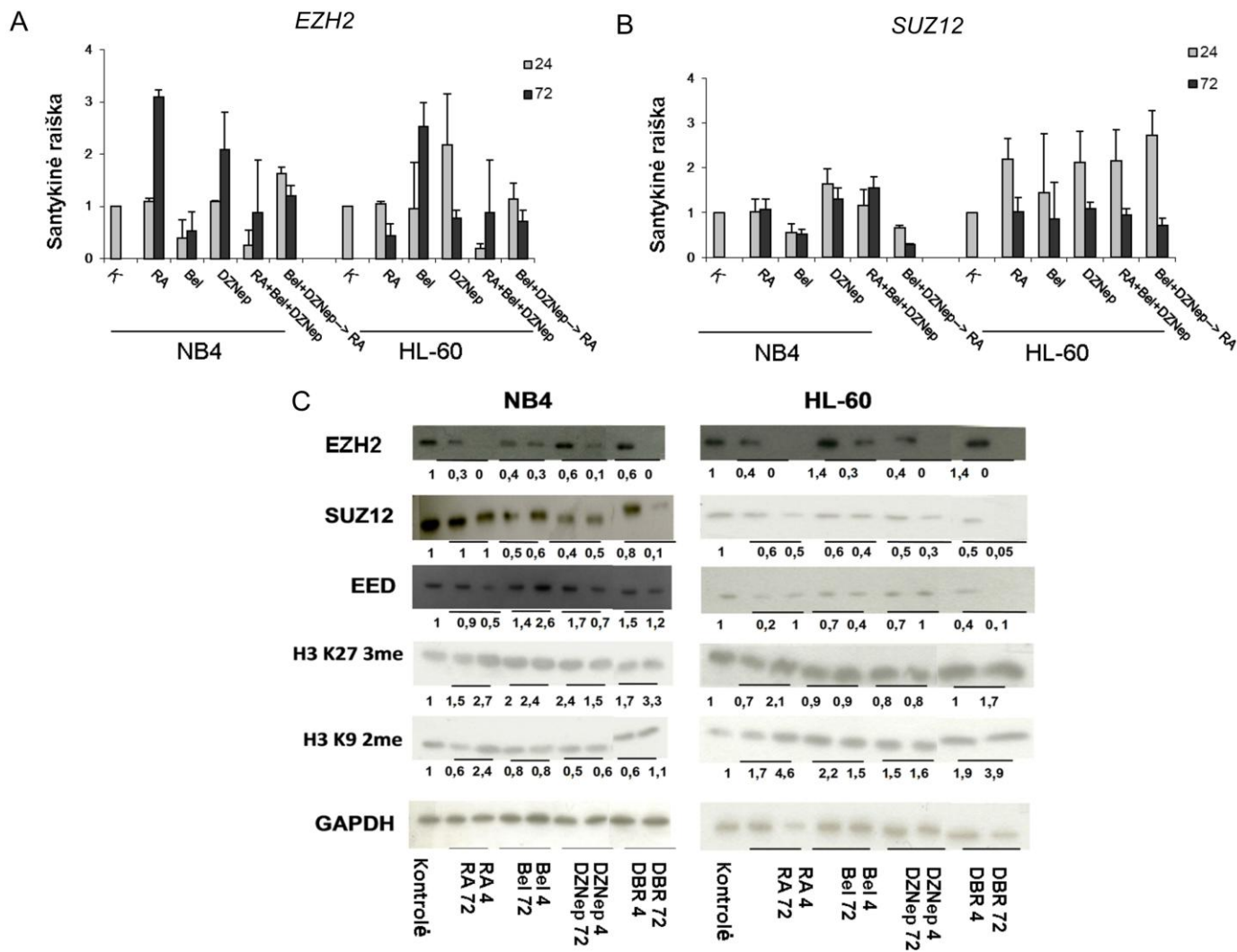


4.3.2.1 pav. Granulocitinė NB4 ir HL-60 ląstelių diferenciacija ir su diferenciacija susijusių genų (*CEBPA*, *CEBPE* bei *PPARG*) raiška. **(A)** NB4 ir HL-60 ląstelės paveiktos 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep, 1 μ M RA + 0,2 μ M Bel, 1 μ M RA + 0,5 μ M DZNep, 0,2 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep + 1 μ M RA ir 0,8 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep (4 h) \rightarrow 1 μ M RA. Diferenciacija išreikšta kaip NBT teigiamų (NBT+) ląstelių procentas. Įvertinta po 24, 48 ir 72 val. poveikio. Rezultatai suvidurkinti, \pm SN. **(B)** NB4 ląstelių CD11b paviršinio žymens raiška nustatyta po 48 val. poveikio 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep + 1 μ M RA bei 0,8 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep (4 h) \rightarrow 1 μ M RA. Duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų tyrimų, kurių metu gauti panašūs rezultatai. **(C)** NB4 ir HL-60 ląstelių *CEBPA*, *CEBPE* ir *PPARG* genų raiškos įvertinimas po 24 ir 72 val. poveikių. Stulpeliai iliustruoja suvidurkintą santykinę geno raišką \pm SN. * – žymi reikšmingus skirtumus ($p \leq 0,05$) tarp RA paveiktų ląstelių ir ląstelių, kurios paveiktos DZNep, belinostatu ar šių junginių ir RA kombinacijomis **(A)** arba žymi skirtumus tarp kontrolinių ir junginiais veiktų ląstelių **(C)** (Valiulienė ir kt., 2017).

4.3.3. Belinostato ir DZNep įtaka ŪPL ląstelių genų ir baltymų raiškai bei histonų H3 ir H4 modifikacijoms

Nustatėme, jog stipriausiai *EZH2* geno raišką abiejose ląstelių linijose sumažino kombinuotas poveikis RA + Bel + DZNep (4.3.3.1A pav.). NB4 ląstelėse registruotas ir *SUZ12* geno raiškos sumažėjimas po poveikių vienu belinostatu ir kombinuoto poveikio Bel + DZNep → RA (4.3.3.1B pav.). HL-60 ląstelėse *EED* iRNR pokyčiai buvo nežymūs. Priešingas efektas pastebėtas NB4 ląstelėse – po 72 val. trukmės poveikių viena RA ar RA kombinacijoje su DZNep ir belinostatu *EED* geno raiška išaugo (duomenys nepateikti; Valiulienė ir kt., 2017). Ši junginių kombinacija taip pat stipriausiai sumažino PRC2 komplekso baltymų kiekį (4.3.3.1C pav.). Pavyzdžiui, po 72 val. kombinuoto poveikio *EZH2* baltymo bendrame baltymų lizate visiškai neaptikta, o *SUZ12* ir *EED* (išskyrus NB4 ląsteles) baltymų aptikti tik pėdsakai. Nors naudotos junginių kombinacijos stipriai sumažino *EZH2* baltymo kiekį, tačiau reikšmingų histono H3 metilinimo (K27me3) pokyčių neregistruota (4.3.3.1C pav.).

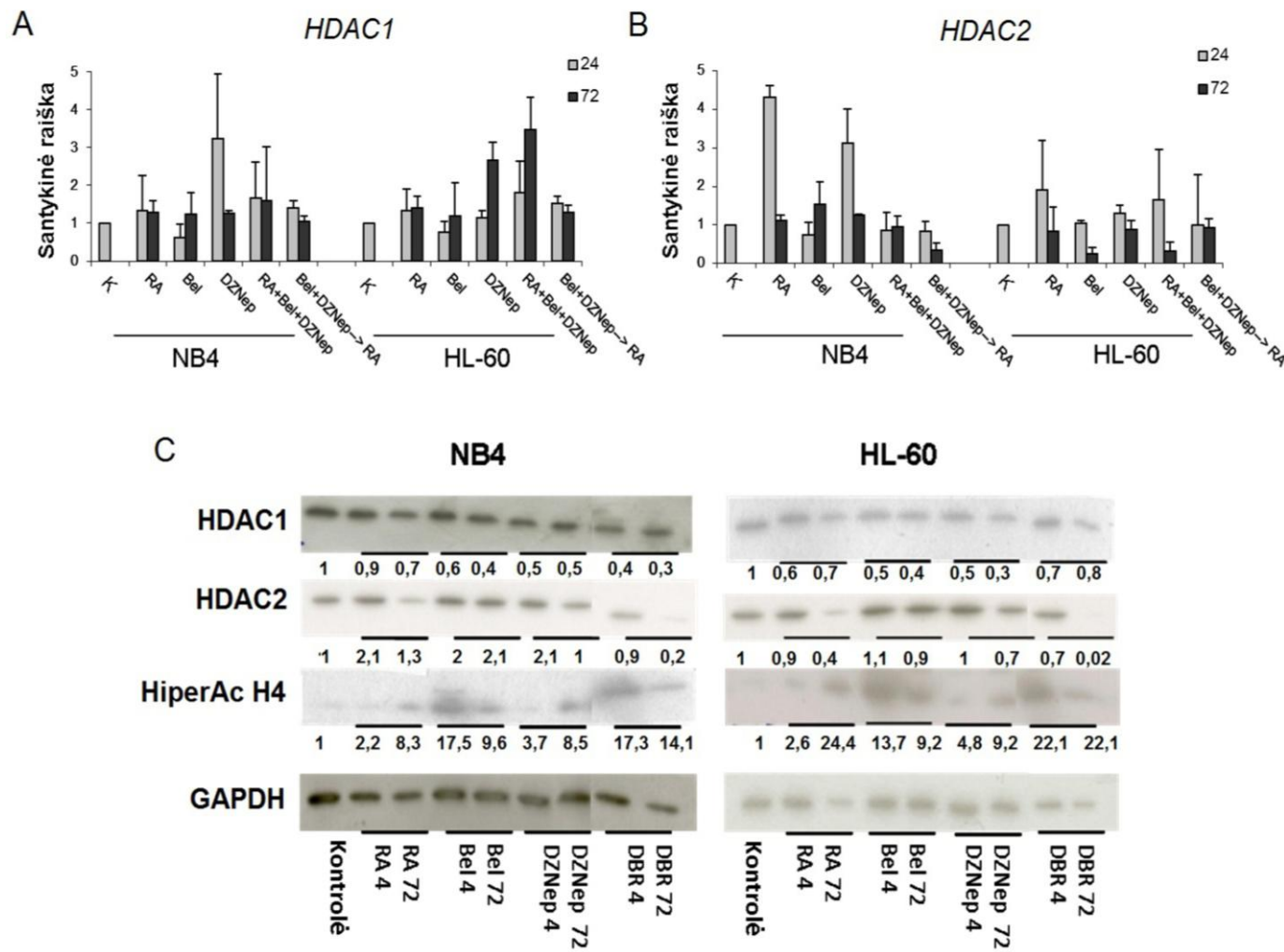
Taip pat įvertinome *HDAC1* ir *HDAC2* genų raišką (4.3.3.2A,B pav.). *HDAC1* geno raiška NB4 ląstelėse stipriai išaugo po 24 val. poveikio su DZNep, o HL-60 ląstelėse *HDAC1* geno raiška padidėjo po 72 val. poveikio DZNep ir naudojant kombinaciją RA + Bel + DZNep. Pastebėta, jog naudoti cheminiai junginiai ir jų kombinacijos skirtingai paveikė genų ir baltymų raišką. Tiek NB4, tiek HL-60 ląstelėse *HDAC1* baltymo kiekis po poveikių sumažėjo (4.3.3.2C pav.). Pavyzdžiui, NB4 ląstelėse, po 72 val. poveikio su kombinacija Bel + DZNep + RA, *HDAC1* baltymo kiekis sumažėjo 70 %, paveikus vienu belinostatu – apytiksliai 60 %. *HDAC2* geno raiškos tyrimai (4.3.3.2B pav.) parodė, jog NB4 ląstelėse *HDAC2* iRNR kiekis labiausiai sumažėjo po 72 val. poveikio Bel + DZNep → RA, o HL-60 ląstelėse stipriausias *HDAC2* geno raiškos nuslopimas registruotas po 72 val. poveikio vienu belinostatu ir kombinacija Bel + DZNep + RA.



4.3.3.1 pav. PRC2 komponentų genų ir baltymų raiškos pokyčiai. (A, B, C) *EZH2*, *SUZ12* ir *EED* genų raiškos pokyčiai po 24 ir 72 val. poveikių 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep, 0,2 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep + 1 μ M RA ir 0,8 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep (4 h) \rightarrow 1 μ M RA. Stulpeliai iliustruoja vidutinę santykinę raiškos vertę \pm SN. * – žymi reikšmingus skirtumus tarp kontrolinių ląstelių ir chemiais junginiais paveiktų ląstelių, $p \leq 0,05$. (D) *EED*, *SUZ12*, *EZH2*, H3 K27me3 ir H3 K9me2 baltymų kiekio pokyčiai po 4 ir 72 val. poveikio 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep ir jų kombinacijomis. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų eksperimentų, kurių metu gauti panašūs rezultatai. Nurodytas santykinis pokytis lyginant su kontrole (Valiulienė ir kt., 2017).

Taip pat įvertinome HDAC2 baltymo kiekio pokyčius leukemijos ląstelėms diferencijuojant į granulocitus (4.3.3.2C pav.). Nustatėme, kad NB4 ląstelėse šio baltymo labiausiai sumažėjo po 72 val. poveikio DZNep, Bel ir RA kombinacija (sumažėjimas siekė iki 82 %). Panašūs dėsningumai pastebėti ir HL-60 ląstelėse.

Mūsų tyrimai taip pat parodė, jog abiejose ląstelių linijose histono H4 acetilinimas (4.3.3.2C pav.) stipriausiai išaugo po kombinuoto poveikio Bel + DZNep + RA (14–22 karto). Galima numanyti, jog NB4 ląstelėse histono H4 acetilinimas daugiausia išaugo dėl HDACi belinostato veikimo, nes nepastebėta didelių pokyčių po poveikių viena RA ar DZNep. Kiek kitokie rezultatai gauti HL-60 ląstelėse: stipriausiai H4 acetilinimą indukavo poveikis viena RA (po 72 val.), nors staigiausias efektas (jau po 4 val.) visgi buvo pastebėtas paveikus su kombinacija DZNep + Bel + RA.



4.3.3.2 pav. HDAC1, HDAC2 genų ir baltymų raiškos pokyčiai bei histono H4 hiperacetilavimo pakitimai. **(A, B)** HDAC1 ir HDAC2 genų raiškos pokyčiai po 24 ir 72 val. poveikių 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep, 0,2 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep + 1 μ M RA ir 0,8 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep (4 h) \rightarrow 1 μ M RA. Stulpeliai iliustruoja vidutinę santykinę raiškos vertę \pm SN. **(C)** HDAC1, HDAC2, hiperacetilinto histono H4 (HiperAc H4) baltymų kiekio pokyčiai po 4 ir 72 val. poveikio 1 μ M RA, 0,2 μ M Bel, 0,5 μ M DZNep ir jų kombinacijomis. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Duomenys iliustruoja vieną iš trijų nepriklausomų eksperimentų, kurių metu gauti panašūs rezultatai. Nurodytas santykinis pokytis lyginant su kontrolė (Valiulienė ir kt., 2017).

4.3.4. Belinostato ir DZNep kombinacijos su RA įtaka bendram HDAC ir EZH2 fermentiniam aktyvumui

Įvertinome bendro HDAC ir EZH2 aktyvumo pokytį NB4 ląstelėse po poveikio kombinacija 0,5 μ M DZNep + 0,2 μ M Bel + 1 μ M RA. Gauti rezultatai parodė, jog jau po 4 val. poveikio naudota kombinacija nuslopina bendrąjį HDAC aktyvumą beveik tris kartus (aktyvumas sumažėjo nuo 312 ng/h/mg kontrolinėse ląstelėse iki 111 ng/h/mg ląstelėse paveiktose DZNep + Bel + RA; duomenys nepateikti). Po poveikio šiais epigenetiškai veikiančiais junginiais taip pat užregistruotas ir EZH2 katalitinio aktyvumo sumažėjimas – kombinacija DZNep + Bel + RA po 4 val. poveikio sumažino EZH2 aktyvumą beveik 3,2 karto. RA, DZNep ir Bel veikdami atskirai tokiu stipriu efektu nepasizymėjo (EZH2 aktyvumo nuslopinimas atitinkamai siekė 2,6, 2,0 ir 1,9 karto; duomenys nepateikti).

4.3.5. Belinostato ir DZNep kombinacijos su RA įtaka acetilinto histono H4 sąveikai su *CEBPA*, *CEBPE* ir *PPARG* promotorinėmis sritimis

Siekėme išsiaiškinti, ar *CEBPA*, *CEBPE* ir *PPARG* raiškos pokyčiai po poveikių su 1 μ M RA ir 0,8 μ M Bel + 0,5 μ M DZNep (4 val.) \rightarrow 1 μ M RA koreliuoja su hiperacetilinto histono H4 sąriša minėtų genų promotorinėse srityse. Šiuo tikslu atlikome chromatino imunoišsodinimo tyrimą. Nustatėme, jog HL-60 ląsteles paveikus DZNep, belinostato ir RA kombinacija *CEBPA* promotorinėje srityje histono H4 hiperacetilinimas išaugo 3–7 kartus (atitinkamai po 12 ir 48 val. poveikio) (4.3.4.1 lentelė). Pažymėtina, kad HL-60 ląstelėse histono H4 hiperacetilinimas *CEBPE* promotorinėje srityje išaugo daugiau nei 14 kartų (po 12 val. poveikio). Visgi NB4 ląstelėse neužfiksuota histono H4 hiperacetilinimo padidėjimo *CEBPA* ir *CEBPE* promotorinėse srityse. Nevienodi rezultatai gauti įvertinus ir histono H4 hiperacetilinimą NB4 bei HL-60 ląstelių *PPARG* promotorinėje srityje. NB4 ląstelėse po poveikių prabėgus 12 val. užfiksuotas nedidelis acetilinimo išaugimas, o HL-60 ląstelėse, priešingai, po 12 val. poveikio viena RA ir

kombinacija Bel + DZNep → RA histono H4 acetilinimas sumažėjo atitinkamai 12 ir 7 kartus.

4.3.4.1 lentelė. Poveikių įtaka histono H4 hiperacetilinimo lygiui *CEBPA*, *CEBPE* ir *PPARG* promotorinėse srityse.

Genai	Poveikiai							
	RA (12)		RA (48)		DZNep + Bel → RA (12)		DZNep + Bel → RA (48)	
	NB4	HL-60	NB4	HL-60	NB4	HL-60	NB4	HL-60
<i>CEBPA</i>	–	2,5–3 ↑	–	2–2,5 ↑	–	3–3,5 ↑	–	6,5–7 ↑
<i>CEBPE</i>	–	2,5–3 ↑	–	–	–	14–14,5 ↑	–	10–10,5 ↑
<i>PPARG</i>	–	12–12,5 ↓	1,5–2 ↑	–	1,5–2 ↑	7–7,5 ↓	–	–

ChIP tyrimas, naudojant antikūną prieš hiperacetilintą histoną H4, atliktas su kontrolinėmis NB4 ir HL-60 ląstelėmis ir ląstelėmis, 12 ir 48 val. paveiktomis 1 μM RA, taip pat 12 ir 48 val. paveiktomis kombinacija 0,5 μM DZNep + 0,8 μM Bel (4 val.) → 1 μM RA. Mėginiai analizuoti naudojant kPGR metodą. Duomenys pateikti kaip IP % pokytis kartais (lyginant su neveikta kontrole). „↑” žymi padidėjimą kartais, „↓” nurodo sumažėjimą kartais, „–” nurodo, jog sumažėjimas ar padidėjimas neviršijo 1,5 karto. Pateikti duomenys yra suvidurkinti (n = 2). SN (nepateikti) buvo mažesni nei 10 % (Valiulienė ir kt., 2017).

4.3.6. Rezultatų aptarimas

Tyrimo metu parodėme, kad RA, HDACi belinostato ir HMTi 3-deazaneplanocino A kombinacija efektyviau stabdo NB4 ir HL-60 ląstelių proliferaciją nei poveikiai vienais RA, belinostatu ar DZNep (4.3.1.1A pav). Stipriausiai ŪPL ląstelių apoptozę indukavo kombinacija RA + Bel+ DZNep (4.3.1.1B pav. ir 4.3.1.2 pav.). Baltymų imuninės analizės tyrimas parodė, jog po poveikių belinostatu, DZNep ir kombinacinio poveikio RA + Bel + DZNep PARP-1 baltymas yra sukarpomas fragmentais (4.3.1.3 pav.).

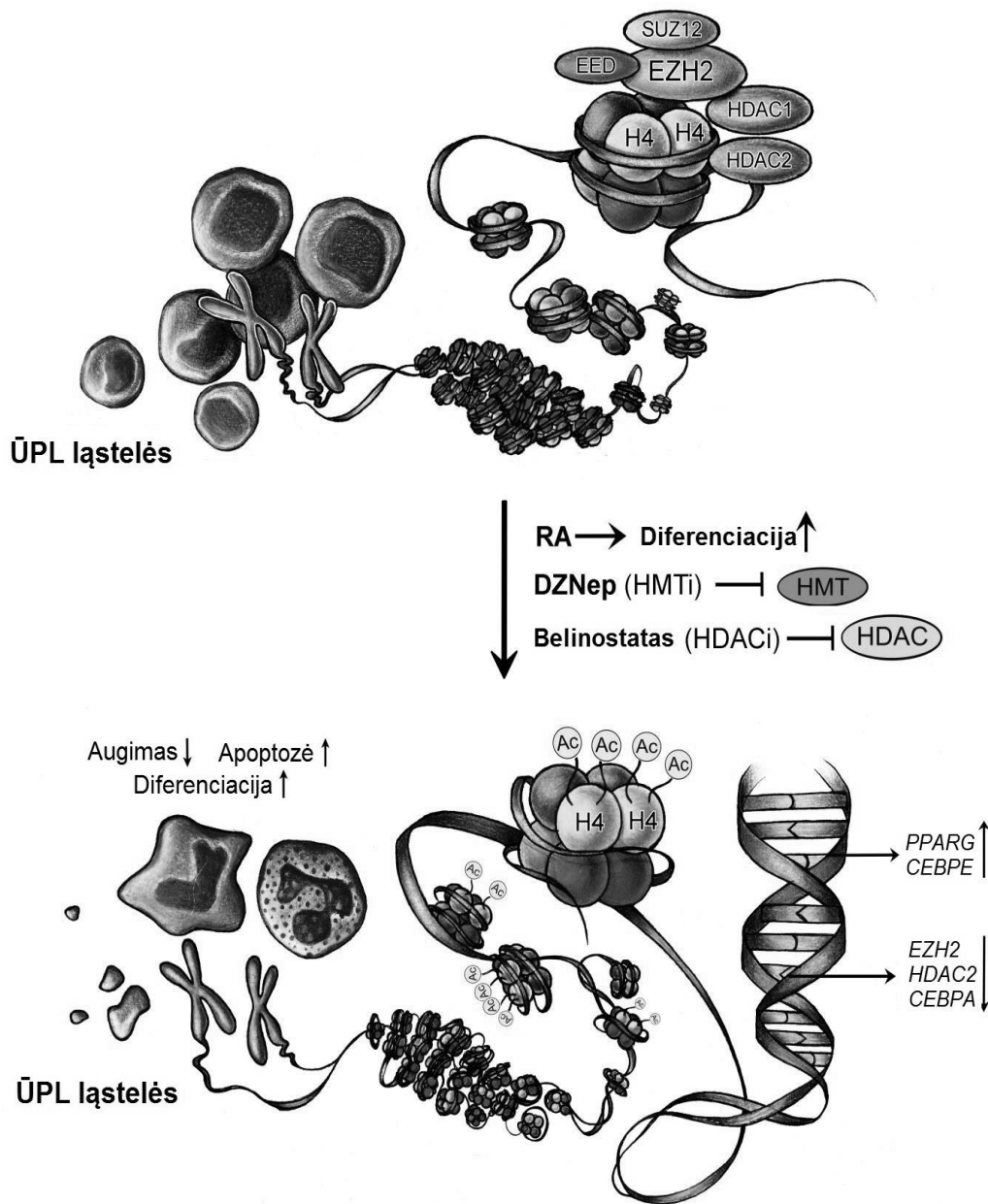
Taip pat įvertinome ir RA kombinacijos su epigenetiniais modulatoriais, belinostatu ir DZNep, poveikį ŪPL ląstelių granulocitinei diferenciacijai. Gauti rezultatai parodė, kad stipriausiai leukemijos ląstelių diferenciaciją indukuoja poveikis Bel + DZNep → RA (4.3.2.1 pav.). Genų raiškos tyrimai atskleidė, kad leukemijos ląstelėms diferencijuojant *CEBPA* raiška slopsta, o *CEBPE*, priešingai, – raiška stiprėja (4.3.2.1.C pav.). *CEBPE* iRNR kiekio padidėjimas

užregistruotas po poveikių RA ir kombinuotų poveikių, kai RA pateikta kartu su HDACi ir / ar HMTi. Panašūs rezultatai publikuoti ir Iriyama ir kt. (2014): po poveikio RA ir valproine rūgštimi autoriai užfiksavo C/EBP ϵ , β ir PU.1 kiekio išaugimą NB4 ląstelėse. Kaip žinia, C/EBP α yra transkripcijos veiksnys, atliekantis itin svarbų vaidmenį mieloidinio vystymosi keliuose – jis veda ląstelių diferenciaciją granulocitine ir monocitine kryptimis. Parodyta, kad daugiau nei pusėje sergančiųjų ŪML šio transkripcijos veiksnio veikla yra sutrikusi (apžv. Avellino ir Delwel, 2017). Hematopoetinėse kamieninėse ląstelėse šio transkripcijos veiksnio raiška būna žema, ląstelėms diferencijuojant jo raiška palaipsniui auga, kol, pasiekus stadiją, kai nesubrendusios mieloidinės ląstelės virsta į brandžius neutrofilus ar monocitus, C/EBP α raiška galiausiai vėl stipriai nuslopinama (Paz-Priel ir Friedman, 2011). Mūsų tyrimai taip pat patvirtino, jog ŪPL blastams diferencijuojant į granulocitus *CEBPA* geno raiška yra nuslopinama (stipriausiai po poveikio viena RA). Reikėtų pažymėti, jog veikdami pavieniui belinostatas ar DZNep, skirtingai nei RA, *CEBPA* geno raiškos intensyvumą kaip tik padidino. DZNep atveju, tai galimai siejasi su tuo, jog EZH2 pats sąveikauja su C/EBP α ir gali nuslopinti pastarojo transkripcinį aktyvumą (Thiel ir kt., 2013). Mes parodėme, kad po poveikio su DZNep, sumažėjus EZH2 baltymo (4.3.3.1 pav.), galimai sumažėja ir C/EBP α transkripcinio aktyvumo slopinimas. Kadangi C/EBP α geba indukuoti ir paties savo *CEBPA* geno raišką (Wu ir kt., 1999), atitinkamai turbūt dėl to ir išauga *CEBPA* iRNR kiekis (4.3.2.1C pav.). Nustatėme, jog po poveikių, ypač po kombinuoto poveikio RA + Bel + DZNep, išauga ir transkripcijos veiksnio PPAR γ geno raiška (4.3.2.1.C pav.). Kaip žinia, PPAR γ veikimas siejamas tiek su ląstelių diferenciacija, tiek su apoptoze (Yasugi ir kt., 2006). Tyrimai patvirtino (Szanto ir Nagy, 2005), kad diferencijuojančiose mieloidinėse ląstelėse vyksta *PPARG* raiška. Ląstelėms vis labiau bręstant, diferencijuojant, *PPARG* raiška taip pat vis didėja.

Poveikis su kombinacija RA + Bel + DZNep taip pat nuslopinė HDAC1 ir HDAC2 baltymų raišką bei sustiprino histono H4 acetilinimą (4.3.3.2 pav.).

ChIP tyrimo duomenys, savo ruožtu, parodė, kad HL-60 ląstelėse po poveikių viena RA ar po kombinacinio poveikio Bel + DZNep → RA *CEBPA* ir *CEBPE* promotorinėse srityse išauga hiperacetilinto histono H4 kiekis (4.3.4.1 lentelė). Tai leidžia numanyti, kad *CEBPE* iRNR kiekio padidėjimas HL-60 ląstelėse, bent iš dalies, priklauso nuo histono H4 acetilinimo *CEBPE* promotorinėje srityje. Reikėtų pažymėti, jog po poveikių vienu belinostatu *CEBPA* ir *CEBPE* promotorinėse srityse histono H4 acetilinimo padidėjimo neužregistruota (Valiuliene ir kt., 2015). Pastarieji rezultatai koreliuoja ir su NBT testo duomenimis, pademonstravusiais, kad, veikdamas pats vienas, belinostatas granulocitinės ŪPL diferenciacijos neindukuoja (4.3.2.1A lentelė).

Fiskus ir kt. (2009) parodė, kad kitas pan-HDACi panabinostatas (LBH589) pirminėse ŪML ląstelėse sumažina PRC2 subvienetų kiekį ir atitinkamai nuslopina modifikaciją H3K27me3. Mes parodėme, kad belinostatas sumažina EZH2, SUZ12 ir EED baltymų raišką ir NB4 bei HL-60 ląstelėse (4.3.3.1 pav.). Visgi stipriausias efektas pastebėtas, kuomet belinostatas veikė kombinacijoje DZNep + Bel + RA – po 72 val. trukmės poveikio EZH2 baltymo raiškos išvis neaptikta. Stebėtina, tačiau H3K27me3 epigenetinės žymės kiekis po poveikio kombinacija DZNep + Bel + RA nesumažėjo. Apibendrinta belinostato ir DZNep kombinacijoje su RA poveikio ŪPL ląstelėms schema pateikta 4.3.5.1 pav.



4.3.5.1 pav. Epigenetinės terapijos, naudojant belinostatą ir DZNep kartu su RA, poveikio ŪPL ląstelėms (NB4 ir HL-60) apibendrinta iliustracija. Poveikis belinostatu, DZNep ir RA sustabdė ŪPL ląstelių augimą bei sustiprino RA indukuotą leukemijos ląstelių granulocitinę diferenciaciją. Diferencijavusios ląstelės vėliau žuvo apoptozės keliu. Pastebėta, jog kombinuotas poveikis nuslopino *EZH2*, *HDAC2* ir *CEBPA* genų bei sustiprino *PPARG* ir *CEBPE* genų raišką. Po poveikio belinostatu, DZNep ir RA užregistruotas ir *EZH2*, *SUZ12*, *EED*, *HDAC1* ir *HDAC2* baltymų kiekio sumažėjimas. Po kombinuoto poveikio stipriai išaugo histono H4 hiperacetilavimas (Valiulienė ir kt., 2017).

4.4. Epigenetinės terapijos įtaka histonų modifikacijų pokyčiams ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir epigenetinių modifikacijų charakterizavimas ksenograftų augliuose

4.4.1. ŪPL ksenograftinio modelio charakterizavimas

Siekėme išsiaiškinti, kokie epigenetiniai pokyčiai vyksta *in vivo* skirtinguose vėžiu sergančio organizmo audiniuose. Tam sukūrėme pelės ksenograftinį ŪPL modelį (imunodeficitinėms NOG pelėms buvo suleista NB4 ląstelių; pasirinktos NB4 ląstelės, nes šioms ląstelėms būdinga tipiška ŪPL translokacija t(15;17); visos procedūros smulkiau aprašytos poskyryje „3.4.17.1. Ksenograftinių ŪPL pelių gavimas ir vėžinių ląstelių infiltracijos įvertinimas“). ŪPL ksenograftinį pelių modelį toliau charakterizavome keletu aspektų. ŪPL ksenograftinių pelių (toliau žymima ŪPL) ir ksenograftinių pelių, gydytų DZNep, Bel ir RA kombinacija (ŪPL-DBR), periferinio kraujo (PK) sudėties įvertinimo duomenys pateikti 4.4.1.1 lentelėje. Ryškiausias baltųjų kraujo kūnelių (BKK) kiekio padidėjimas užregistruotas negydytose ŪPL ksenograftinėse pelėse (lyginta su kontrolinėmis NOG pelėmis). Tai gali būti siejama su hiperleukocitozės pasireiškimu, kuri yra gana dažna kai kurių ŪPL atveju (Testi ir kt., 2005). Visoms ksenograftinėms pelėms, palyginus su kontrolinėmis NOG pelėmis, išaugo neutrofilų (NEU) skaičius, o eozinofilų (EOZ), priešingai, – sumažėjo. Būtina pažymėti, kad gydymas epigenetiškai veikiančiais junginiais prailgino ŪPL ksenograftinių pelių išgyvenimo trukmę: ŪPL-DBR pelės išgyveno 46 d. ±5 d., o negydytos ŪPL pelės išgyveno 41 d. ±1 d. (Valiulienė ir kt., 2016).

4.4.1.1 lentelė. Gydymo įtaka ŪPL ksenografinių pelių ligos vystymuisi. Bendrasis kraujo tyrimas iliustruoja santykinius įverčius (lyginta su neveiktomis kontrolinėmis NOG pelėmis). Kiekvienoje tyrimo grupėje buvo po 3 gyvūnus. Rezultatai pateikti kaip matavimų vidurkiai, \pm SN. Santrumpos: It – laukinis tipas; K – kontrolė, BKK – baltieji kraujo kūneliai; LIM – limfocitai; MON – monocitai; NEU – neutrofilai; EOZ – eozinofilai; HGB – hemoglobinas; HKT – hematokritas; RKK – raudonieji kraujo kūneliai; VLT – vidutinis ląstelių tūris; KP – kraujo plokštelės (trombocitai) (Valiulienė ir kt., 2016).

		Tiriamosios grupės			
		It	K	ŪPL	ŪPL - DBR
Išgyvenimo trukmė (paros po ksenografinių pelių gydymo)				41 (\pm 1)	46 (\pm 5)
Auglių formavimasis		–	–	augliai kaklo, šlapimo pūslės ir pilvo srityse; žarnyno išopėjimas	žarnyno išopėjimas
Bendras kraujo tyrimas (lyginta su kontrole)	BKK	0,7	1	4,1 (\pm 0,3)	2,3 (\pm 0,1)
	LIM	0,7	1	0,6 (\pm 0,2)	0,8 (\pm 0,1)
	MON	0,6	1	1,3 (\pm 0,2)	1,1 (\pm 0,2)
	NEU	1,2	1	1,1 (\pm 0,1)	1,1 (\pm 0,1)
	EOZ	0,8	1	0,2 (\pm 0,0)	0,8 (\pm 0,2)
	HGB	0,8	1	0,7 (\pm 0,0)	0,9 (\pm 0,1)
	HKT	0,9	1	0,8 (\pm 0,0)	0,9 (\pm 0,1)
	RKK	0,8	1	0,7 (\pm 0,1)	0,9 (\pm 0,1)
	VLT	1,1	1	1 (\pm 0,1)	1 (\pm 0,0)
	KP	0,4	1	1,3 (\pm 0,3)	1,3 (\pm 0,2)
Genų raiška (santykinis pokytis lyginant su ŪPL pelėmis)	<i>WT1</i>	–	–	1	0,4 (\pm 0,1)
	<i>PML-RARA</i>	–	–	1	–
	<i>CSF3</i>	–	–	1	5,3 (\pm 0,6)
	<i>CSFR</i>	–	–	1	0,5 (\pm 0,2)
Tėkmės citometriniis įvertinimas, %	CD15	2,2	3,1	4 (\pm 0,0)	8,3 (\pm 5,4)
	CD33	1,6	1,2	12,2 (\pm 4,6)	3,8 (\pm 2,8)
	CD45	2,8	2,9	16,8 (\pm 6,7)	5,1 (\pm 2,9)

Leukemijos ląstelių infiltracija NOG pelėse taip pat įvertinta atlikus periferinio kraujo tam tikrų genų (*WT1*, *PML-RARA*, *CSF3* ir *CSFR*) kPGR ir ląstelių paviršinių žymenų (CD15, CD33 ir CD45) tyrimą. Rezultatai pateikti 4.4.1.1 lentelėje kaip santykiniai dydžiai (lyginta su kontrolinėmis ŪPL ksenograftinėmis pelėmis (ŪPL)). Yra žinoma, jog *WT1* geno raiška sveikų individų periferiniame kraujyje būna labai žema arba net išvis neaptinkama, tačiau parodyta, jog, sergant ūmine limfoidine ar ūmine mieloidine leukemija, *WT1* iRNR kiekis išauga bei gali pasitarnauti ir kaip prognostinis žymuo (Lindstedt ir kt., 2014; Yoon ir kt., 2017). Mūsų atliktų tyrimų metu žmogaus *WT1* geno raiškos, kaip ir tikėtasi, neaptikta laukinio tipo (It) ir kontrolinių NOG pelių (K) periferiniame kraujyje. *WT1* iRNR aptikta tiek negydytose ksenograftinės ŪPL pelėse (ŪPL), tiek ir gydytose epigenetiškai veikiančiais junginiais (ŪPL-DBR). Šiuo atveju gydytose ksenograftinėse pelėse *PML-RARA* geno raiškos neužfiksuota. ŪPL-DBR ksenograftinėms pelėms taip pat buvo charakteringas aukštas *CSF3* (koloniją stimuliuojančio veiksnio, atsakingo už neutrofilų gamybą hematopoezės metu) raiškos lygis (lyginant su ŪPL pelėmis, didesnis 5,3 karto). Apibendrinus pastaruosius rezultatus, būtų galima daryti prielaidą, jog epigenetinė terapija, kurią taikėme ŪPL ksenograftinių pelių gydymui, buvo efektyvi.

Tėkmės citometrinis ląstelės mieloidinės kilmės paviršinių žymenų CD33 ir CD45 bei CD15 (pastarasis nurodo ŪPL ląstelių diferenciaciją po stimuliacijos RA) (Namikawa ir kt., 1993; Liu ir kt., 1996; Majeti ir kt., 2009) tyrimas parodė, jog po ksenotransplantacijos (prieš pasirodant tipiškiems ligos simptomams) pelių periferiniame kraujyje išaugo žmogaus CD33+ ir CD45+ populiacijos (4.4.1.1 lentelė). Be to, šie duomenys teigiamai koreliavo ir su baltųjų kraujo kūnelių kiekio padidėjimu ksenograftinių ŪPL pelių periferiniame kraujyje.

Pažymėtina, kad kontrolinėms ŪPL ksenograftinėms pelėms susiformavo augliai (kaklo, šlapimo pūslės ir pilvo srityse), taip pat buvo pakenktas ir žarnynas (susiformavo opos). Užregistruotas ir vieno iš inkstų sumažėjimas. Remdamiesi atliktais tyrimais, manome, jog gydymas epigenetiškai

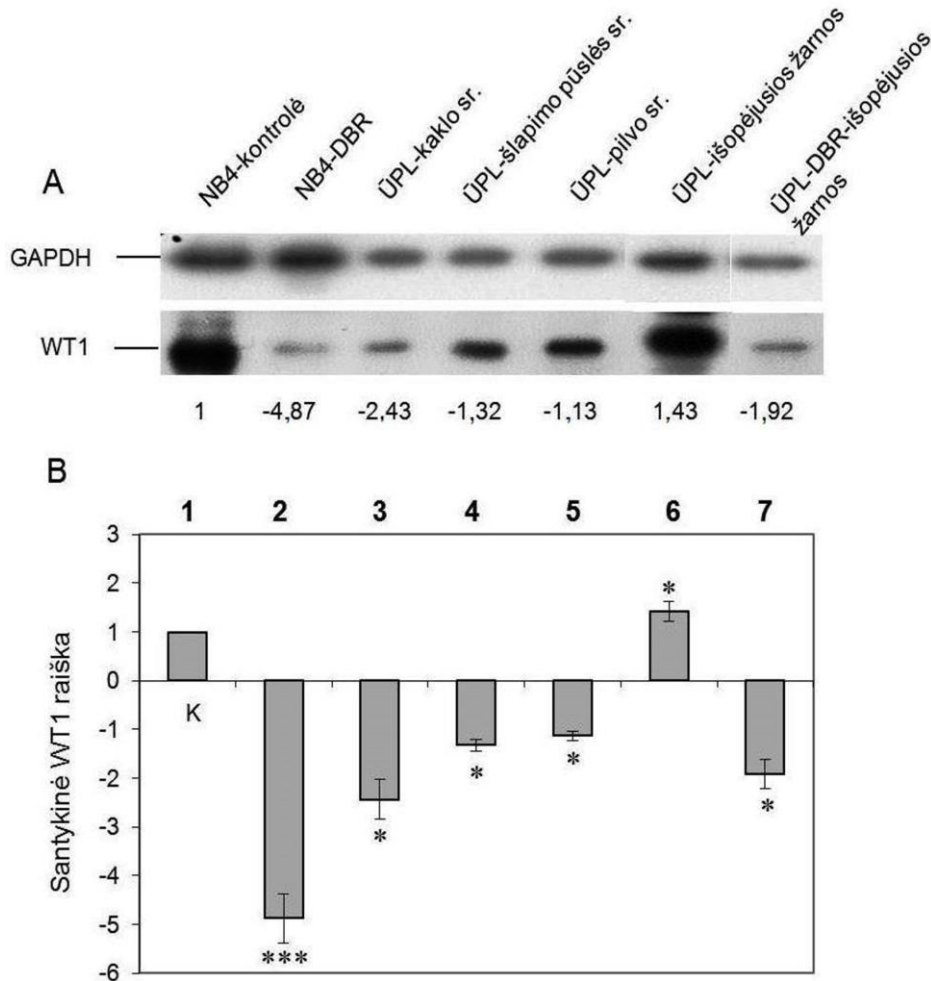
veikiančiais medikamentais (ŪPL-DBR) apsaugojo nuo auglių susiformavimo (gydytose ksenograftinėse pelėse užregistruoti tik žarnyno išopėjimai).

4.4.2. WT1 baltymo raiška ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir susiformavusiuose augliuose

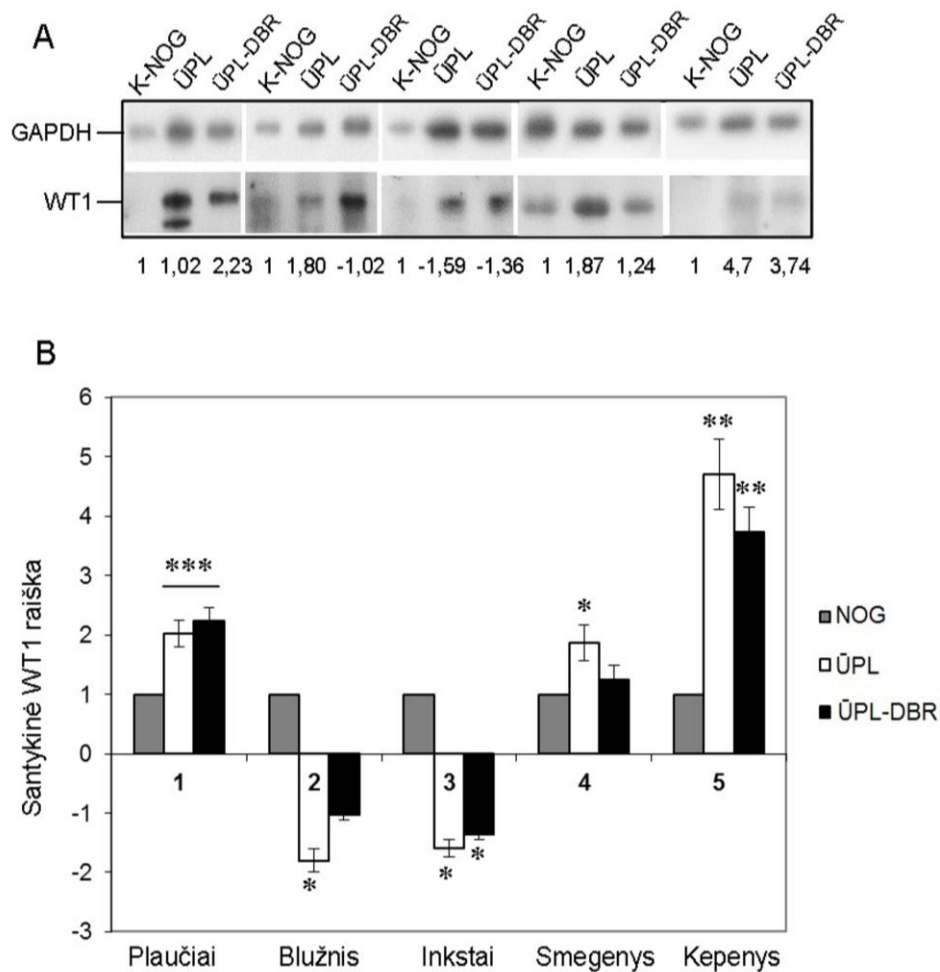
Norėdami įvertinti WT1, kaip galimo ŪPL prognostinio žymens, tinkamumą, palyginome WT1 baltymo raišką negydytų ksenograftinių pelių (ŪPL) ir epigenetiškai veikiančiais junginiais gydytų ksenograftinių pelių (ŪPL-DBR) audiniuose ir susiformavusiuose augliuose. Kaip kontrolė naudotos niekuo neveiktos NB4 ląstelės. Baltymų imuninės analizės rezultatai (4.4.2.1 pav.) parodė, jog kontrolinėse NB4 ląstelėse WT1 baltymo aptinkama daug, o 48 val. poveikis DZNep, Bel ir RA kombinacija WT1 baltymo kiekį stipriai sumažina (4,87 karto). Pažymėtina, jog WT1 baltymo aptikta visuose ŪPL ksenograftinių pelių augliuose, didžiausi kiekiai rasti pilvo srities ir šlapimo pūslės augliuose. Panašiai kaip ir kontrolinėse NB4 ląstelėse, išopėjusiose negydytų ksenograftinių pelių žarnose taip pat rastas itin didelis kiekis WT1 baltymo. Visgi po gydymo kombinacija DZNep + Bel + RA ksenograftinių pelių išopėjusiose žarnose WT1 baltymo aptikta gerokai mažiau.

Taip pat įvertinome WT1 baltymo kiekio skirtumus atskirų organų audiniuose (4.4.2.2 pav.). ŪPL ksenograftinės pelės WT1 baltymo daugiau nei kontrolinės NOG pelės (K-NOG) turėjo plaučiuose ir smegenyse (2,02 ir 1,87 karto daugiau). Visgi didžiausias WT1 baltymo kiekis aptiktas kepenyse (4,70 karto daugiau nei K-NOG). Po ksenograftinių ŪPL pelių gydymo DZNep, Bel ir RA WT1 baltymo kiekis šiek tiek sumažėjo smegenyse (buvo 1,24 karto daugiau nei kontrolėje) ir kepenyse (3,74 karto daugiau nei kontrolinėse pelėse). Žemesnė nei kontrolinėse NOG pelėse WT1 baltymo raiška užregistruota negydytų ŪPL ksenograftinių pelių blužnyje ir inkstuose (lyginant su kontrole, atitinkamai 1,80 ir 1,59 karto), taip pat ir ŪPL ksenograftinėse pelėse po gydymo DZNep, Bel ir RA (raiška atitinkamai 1,02 ir 1,36 karto žemesnė nei kontrolėje). Kadangi tiek mieloidinės

leukemijos ląstelėms, tiek ir auglius formuojančioms ląstelėms būdinga aukšta WT1 baltymo raiška, WT1 gali pasitarnauti kaip vienas iš žymenų, padedančių atskirti sveikus ir ligos pakenktus audinius. Mūsų tyrimas atskleidė, jog galimai labiausiai ligos pažeidžiami yra ŪPL ksenograftinių pelių plaučiai, smegenys bei kepenys.



4.4.2.1 pav. WT1 baltymo raiška ŪPL ksenograftinių pelių augliuose. Baltymai išskirti iš kontrolinių, niekuo neveiktų, NB4 ląstelių (NB4-kontrolė-1) ir iš NB4 ląstelių, 48 val. paveiktų DZNep, Bel ir RA kombinacija (NB4-DBR-2). Baltymai taip pat išskirti iš ŪPL ksenograftinių pelių auglių, susiformavusių kaklo (3), šlapimo pūslės (4), pilvo (5) srityse ir iš išopėjusio žarnyno: tiek negydytų ŪPL ksenograftinių pelių (6), tiek DZNep, Bel ir RA gydytų ŪPL ksenograftinių pelių (7). **(A)** WT1 baltymo kiekis įvertintas baltymų imuninės analizės (angl.: *western blot*) metodu. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Imuninės analizės tyrimas buvo atliktas mažiausiai du kartus (gauti panašūs rezultatai). **(B)** Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Nurodytas santykinis pokytis palyginus su neveikta NB4 kontrole. Pateiktas rezultatų vidurkis \pm SN (iš trijų tirtų pelių), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) (Valiulienė ir kt., 2016).



4.4.2.2 pav. WT1 baltymo raiška ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose. Baltymai išskirti iš kontrolinių NOG pelių (K-NOG), negydytų ŪPL ksenograftinių pelių (ŪPL) ir gydytų DZNeP, Bel ir RA kombinacija ŪPL ksenograftinių pelių (ŪPL) plaučių (1), blužnies (2), inkstų (3), smegenų (4) ir kepenų (5). **(A)** WT1 baltymo kiekis įvertintas baltymų imuninės analizės (angl.: *western blot*) metodu. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Imuninės analizės tyrimas buvo atliktas mažiausiai du kartus (gauti panašūs rezultatai). **(B)** Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Nurodytas santykinis pokytis palyginus su kontrole (NOG pelėmis). Pateiktas rezultatų vidurkis \pm SN (iš trijų tirtų pelių), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) (Valiulienė ir kt., 2016).

4.4.3. Histonų modifikacijų pobūdis ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir susiformavusiuose augliuose

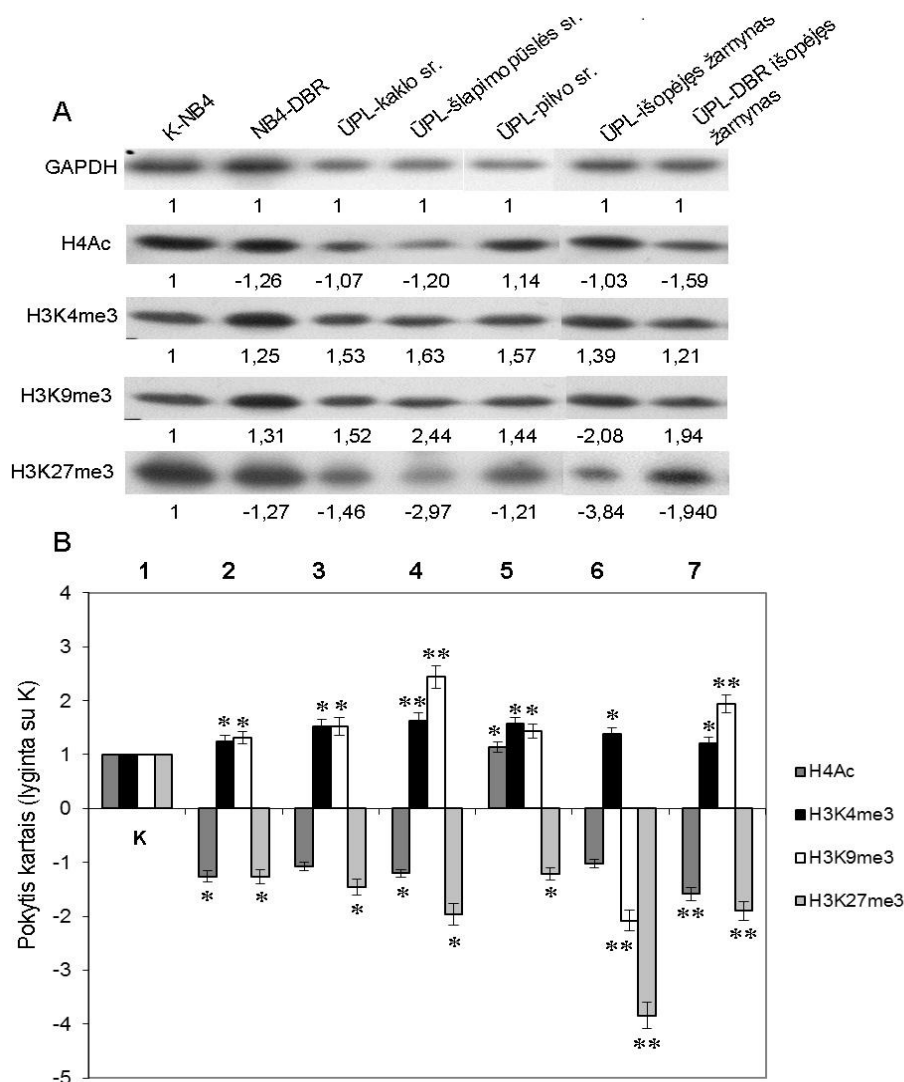
Yra žinoma, jog potransliacinės histonų modifikacijos atlieka svarbų vaidmenį reguliuodamos normalių ir vėžinių ląstelių genų raišką (Baylin, 2012). Dėl to praplėtėme savo tyrimus ir apžvelgėme euchromatino žymenų (acetilinto histono H4 padėtyje K16 (H4Ac) ir trimetilinto histono H3

padėtyje K4 (H3K4me3)), taip pat ir heterochromatino žymenų (trimetilinto histono H3 padėtyje K9 (H3K9me3) ir trimetilinto histono H3 padėtyje K27 (H3K27me3)) pasiskirstymą ŪPL ksenograftinių pelių audiniuose ir susiformavusiuose augliuose.

Įvardintų epigenetinių žymenų raiškos ŪPL ksenograftinių pelių augliuose duomenys pateikti 4.4.3.1 pav. Kaip kontrolė įvertintas H4Ac, H3K4me3, H3K9me3 ir H3K27me3 modifikacijų kiekis neveiktose NB4 ląstelėse. Pastebėta, jog po kombinuoto poveikio DZNep + Bel + RA NB4 ląstelėse išaugo H3K4me3 ir H3K9me3 kiekis, o H4Ac ir H3K27me3 kiekis sumažėjo. Parodėme, kad histono H4 acetilinimo lygis išopėjusiam žarnyne, kaklo bei šlapimo pūslės srities augliuose buvo žemesnis nei NB4 kontrolinėse ląstelėse (lyginant su NB4 kontrole, mažiau 1,1–1,5 karto). Augliuose, susiformavusiuose pilvo srityje, priešingai, – H4Ac lygis buvo aukštesnis nei kontrolėje (1,5 karto). Visuose ksenograftinių pelių augliuose ir išopėjusiam žarnyne H3K4me3 raiškos lygis buvo labai panašus ar tik šiek tiek aukštesnis nei kontrolinėse NB4 ląstelėse. Tokie patys dėsniumai pastebėti ir kalbant apie H3K9me3 raišką tirtuose augliuose (tik šlapimo pūslės augliuose užregistruotas ryškesnis H3K9me3 modifikacijos kiekio išaugimas). Epigenetiškai veikiančiais junginiais paveiktose NB4 ląstelėse, taip pat ir daugelyje auglių, H3K27me3 modifikacijos kiekis buvo žemesnis nei kontrolinėse NB4 ląstelėse (1,2–2 karto).

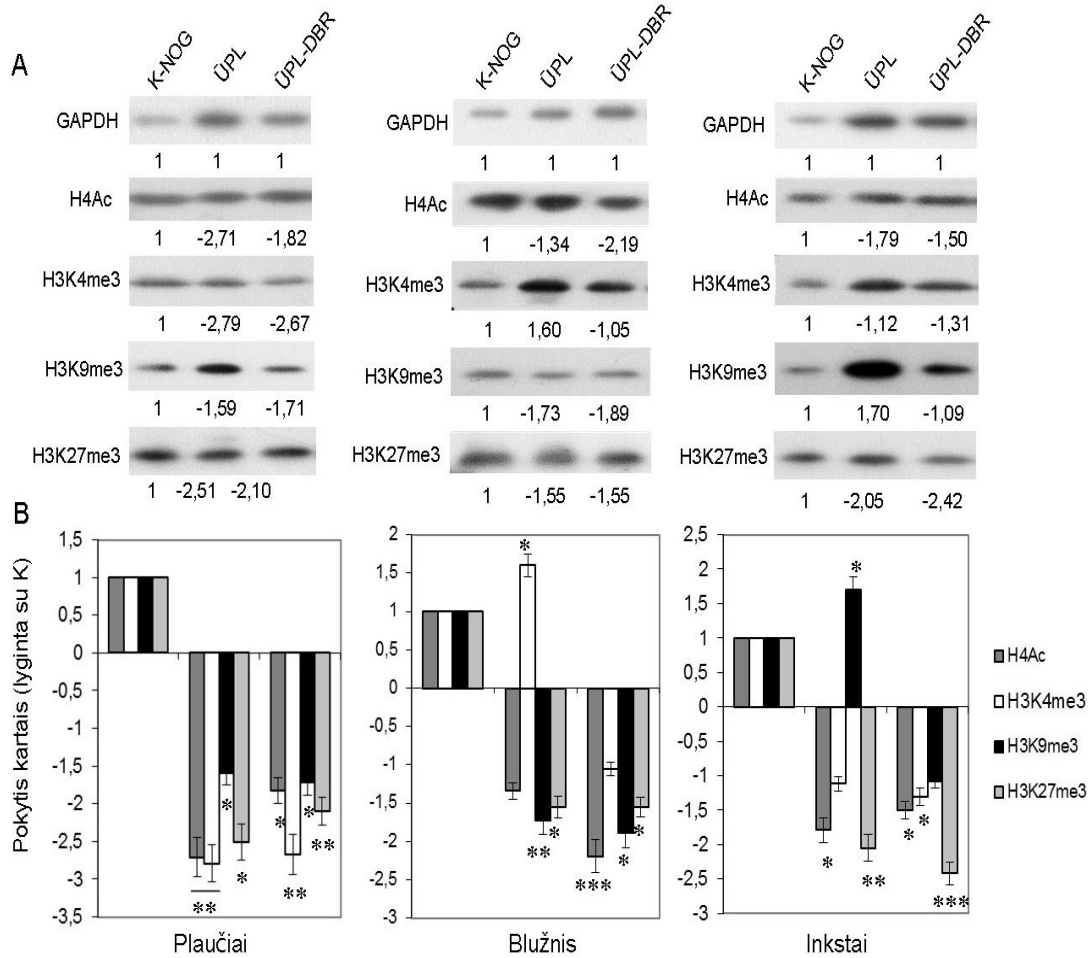
Kalbant apie ryškiausius heterochromatinių histonų modifikacijų H3K9me3 ir H3K27me3 pokyčius reikėtų pažymėti, jog jie buvo užfiksuoti išopėjusiam ŪPL ksenograftinių pelių žarnyne (kiekis atitinkamai buvo 2,08 ir 3,84 karto mažesnis nei kontrolinėse NB4 ląstelėse). Visgi po gydymo DZNep, Bel ir RA kombinacija ŪPL ksenograftinių pelių išopėjusiose žarnose H3K9me3 modifikacijos kiekis reikšmingai išaugo (buvo 1,94 karto aukštesnis nei kontrolėje). Pastarasis rezultatas galimai sietinas ir su WT1 baltymo kiekio sumažėjimu ŪPL ksenograftinių pelių išopėjusiose žarnose po gydymo DZNep, Bel ir RA kombinacija (4.4.2.1 pav.). Susumuojant, būtų galima pasakyti, jog ksenograftinių pelių augliuose, priklausomai nuo auglių kilmės ir

galimai priklausomai nuo leukemijos ląstelių infiltracijos į juos, heterochromatino žymens H3K27me3 kiekis būna mažesnis nei aktyviai proliferuojančiose NB4 ląstelėse, o euchromatino žymens H3K4me3 aptinkama daugiau nei kontrolinėse NB4 ląstelėse.

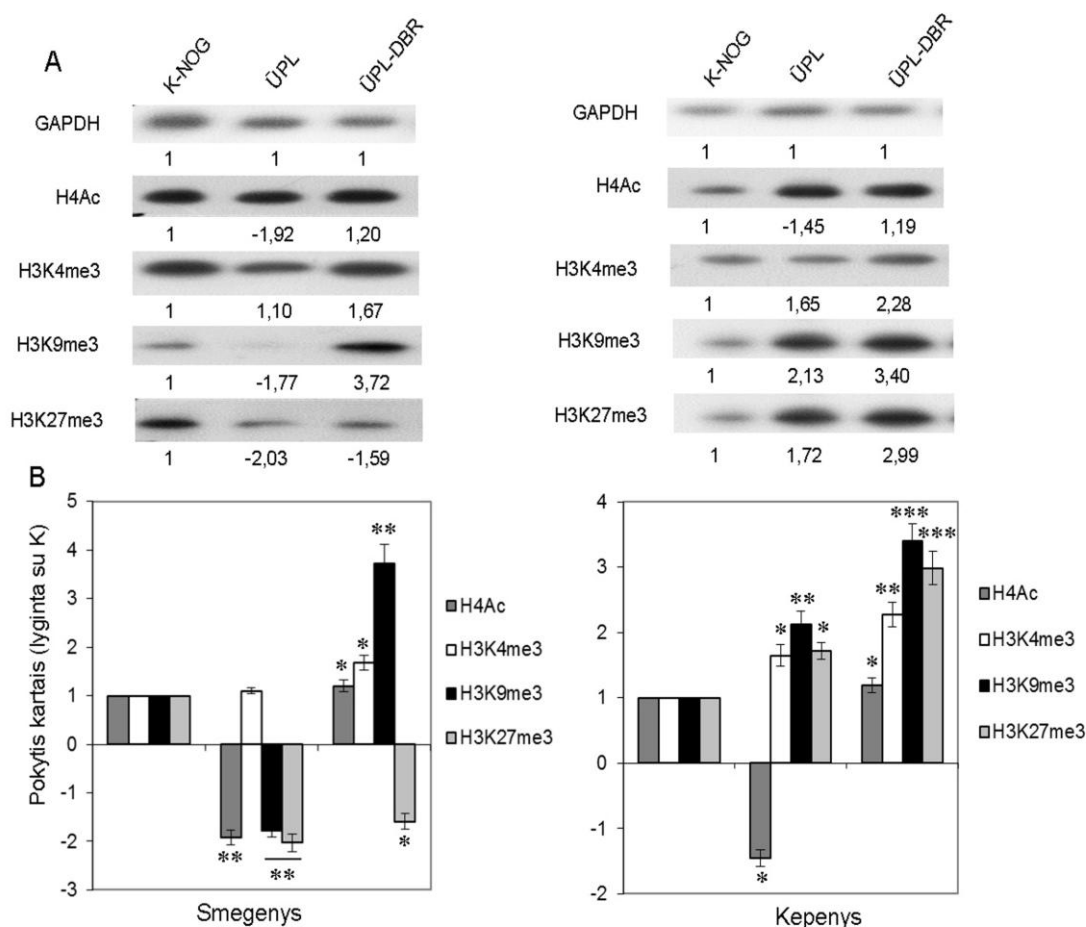


4.4.3.1 pav. Histonų modifikacijos ŪPL ksenograftinių pelių augliuose. Baltymai išskirti iš kontrolinių (neveiktų) NB4 ląstelių (K-NB4-1), iš 48 val. DZNep, Bel ir RA kombinacija paveiktų NB4 ląstelių (NB4-DBR-2), taip pat iš ŪPL ksenograftinių pelių auglių kaklo (3), šlapimo pūslės (4) ir pilvo srityse (5) bei iš negydytų ŪPL ksenograftinių pelių išopėjusio žarnyno (6) ir iš gydytų ŪPL ksenograftinių pelių išopėjusio žarnyno (7). **(A)** H4Ac, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 modifikacijų kiekis įvertintas baltymų imuninės analizės (angl.: *western blot*) metodu. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Imuninės analizės tyrimas buvo atliktas mažiausiai du kartus (gauti panašūs rezultatai). **(B)** Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Nurodytas santykinis pokytis palyginus su kontrole (NOG pelėmis). Pateiktas rezultatų vidurkis \pm SN (iš trijų tirtų pelių), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) (Valiulienė ir kt., 2016).

Tyrimų metu įvertinome ir epigenetinių žymenų raišką negydytų ŪPL ksenograftinių pelių ir ksenograftinių ŪPL pelių, gydytų DZNep, Bel ir RA kombinacija, nenavikiniuose audiniuose (plaučiuose, blužnyje, inkstuose, smegenyse bei kepenyse). Kaip parodyta 4.4.3.2 ir 4.4.3.3 pav., tirtus audinius būtų galima suskirstyti į dvi grupes. Pirmajai grupei priklausytų plaučiai, blužnis ir inkstai (4.4.3.2 pav.) – juose tirtųjų modifikacijų kiekis buvo žemesnis nei kontrolinėse NOG pelėse. Pavyzdžiui, H4Ac ir H3K4me3 lygis ŪPL ksenograftinėse pelėse, tiek gydytose, tiek negydytose, buvo apytiksliai 2 kartus mažesnis nei NOG pelėse (visgi ŪPL ksenograftinių pelių blužnyse užfiksuotas H3K4me3 modifikacijos kiekio išaugimas 1,6 karto lyginant su kontrole; tiesa, po gydymo DBR kombinacija H3K4me3 lygis ŪPL ksenograftinių pelių blužnyse sumažėjo). Heterochromatino žymenų H3K9me3 ir H3K27me3 kiekis ŪPL ksenograftinių pelių plaučiuose, blužnyje ir inkstuose taip pat buvo sumažėjęs. Kiek ryškesni epigenetinių žymenų raiškos pokyčiai užfiksuoti antrosios grupės audiniuose (4.4.3.3 pav.). ŪPL ksenograftinių pelių smegenyse ir kepenyse H4Ac lygis buvo žemesnis nei kontrolinėse NOG pelėse (atitinkamai 1,92 ir 1,45 karto; tiesa, ŪPL ksenograftinėse pelėse, gydytose DBR, H4Ac lygis išaugo ir buvo kiek aukštesnis nei kontrolėje). Stipriausiai H3K4me3, H3K9me3 ir H3K27me3 raiška vyko gydytų ŪPL ksenograftinių pelių smegenyse ir kepenyse. Ypač reikšmingai (lyginant su kontrole) pagausėjo H3K9me3 (abiejuose audiniuose šios modifikacijos lygis buvo ~3 kartus aukštesnis nei kontrolėje) ir H3K27me3 (kepenyse taip pat ~3 kartus daugiau nei kontrolėje). Kaip matyti, epigenetinis „paveikslas“ ŪPL ksenograftinių pelių smegenyse ir kepenyse skyrėsi nuo pastarojo plaučiuose, blužnyje ir inkstuose. Visgi galima apibendrinti, jog visų minėtų organų audiniuose, vykstant piktybėjimo procesams, t. y., ŪPL ksenograftinėms pelėms susergant, audinių ląstelių chromatinas neliko statiškas – kito jo epigenetinė struktūra. Pastebėta, jog specifiniai histonų modifikacijų pokyčiai epigenetinio gydymo metu ŪPL ksenograftinių pelių somatiniuose audiniuose priklausė nuo audinių piktybiškumo bei funkcinio aktyvumo.



4.4.3.2 pav. Histonų modifikacijų pokyčiai ŪPL ksenograftinių pelių plaučiuose, blužnyje ir inkstuose po poveikio epigenetiškai veikiančiais junginiais. Baltymai išskirti iš kontrolinių pelių (K-NOG), negydytų ŪPL ksenograftinių pelių (ŪPL) ir DZNep, Bel ir RA gydytų ksenograftinių pelių (ŪPL-DBR) plaučių, blužnies ir inkstų. (A) H4Ac, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 modifikacijų kiekis įvertintas baltymų imuninės analizės (angl.: *western blot*) metodu. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Imuninės analizės tyrimas buvo atliktas mažiausiai du kartus (gauti panašūs rezultatai). (B) Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Nurodytas santykinis pokytis palyginus su kontrole (NOG pelėmis). Pateiktas rezultatų vidurkis \pm SN (iš trijų tirtų pelių), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) (Valiulienė ir kt., 2016).



4.4.3.2 pav. Histonų modifikacijų pokyčiai ŪPL ksenograftinių pelių smegenyse ir kepenyse. Baltymai išskirti iš kontrolinių pelių (K-NOG), negydytų ŪPL ksenograftinių pelių (ŪPL) ir DZNep, Bel ir RA gydytų ksenograftinių pelių (ŪPL-DBR). **(A)** H4Ac, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 modifikacijų kiekis įvertintas baltymų imuninės analizės (angl.: *western blot*) metodu. Kaip kontrolė naudotas GAPDH. Imuninės analizės tyrimas buvo atliktas mažiausiai du kartus (gauti panašūs rezultatai). **(B)** Gauti rezultatai nuskenuoti, o optinis tankis įvertintas *ImageJ* programa. Nurodytas santykinis pokytis palyginus su kontrole (NOG pelėmis). Pateiktas rezultatų vidurkis \pm SN (iš trijų tirtų pelių), $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**) ir $p \leq 0,0001$ (***) (Valiulienė ir kt., 2016).

4.4.4. Rezultatų aptarimas

Mūsų tyrimų metu NB4 ląstelės *in vivo* ksenograftinėse pelėse suformavo auglius kaklo, šlapimo pūslės ir pilvo srityse. Ankstesni kitų grupių tyrimai parodė, kad ŪML ląstelės (HL-60, KG1, KG1a), suleistos *BALB/c nude* pelių jaunikliams, suformavo plintančius auglius, tokius kaip mielosarkomas, o hematopoetiniuose audiniuose šių ląstelių nebuvo aptikta (Machado ir kt., 1984). Pažymėtina, jog inokuliuotos leukemijos ląstelės išlaikė gebėjimą

proliferuoti. Visgi ŪML ksenograftinėse *BALB/C nude* pelėse, lyginant su kontrolinėmis pelėmis, bendras periferinio kraujo ląstelių skaičius ir skirtingų ląstelių tipų procentinė dalis liko nepakitusi (Machado ir kt., 1984). Mūsų tyrimų metu, NB4 ląsteles injekavus imunodeficitinėms NOG pelėms, pastarųjų periferinio kraujo mėginiuose akivaizdžiai išaugo ląstelių populiacija, turinti žmogaus CD33+, CD45+ (4.4.1.1 lentelė). Šie rezultatai koreliavo ir su baltųjų kraujo kūnelių (BKK) kiekio padidėjimu (4.4.1.1 lentelė). Reikėtų paminėti, jog kai kuriems ŪPL atvejams hiperleukocitozė taip pat būdinga (Testi ir kt., 2005). Parodėme, kad gydymas RA ir epigenetiškai veikiančiais junginiais (DBR) sumažino BKK, CD33+ ir CD45+ ląstelių bei padidino CD15+ ląstelių skaičių ŪPL ksenograftinių pelių periferiniame kraujyje. Taip pat pastebėtas ir *CSF3* geno raiškos išaugimas (4.4.1.1 lentelė). Be to, epigenetinė terapija prailgino ŪPL ksenograftinių pelių gyvenimo trukmę ir apsaugojo jas nuo auglių susiformavimo.

Parodyta, jog ŪML sergančių žmonių kraujyje ir standartinėse ŪML ląstelių linijose auglio slopiklio *WT1* geno raiška būna padidėjusi (Miyagi ir kt., 1993; Brieger ir kt., 1994). Išplėtėme savo atliekamus tyrimus ir įvertinome *WT1* geno ir baltymo raišką. Siekėme išsiaiškinti, ar *WT1* raiška gali pasitarnauti kaip žymuo, padedantis įvertinti taikomos terapijos efektyvumą. Gauti rezultatai parodė, kad ŪPL ksenograftinių pelių augliuose *WT1* baltymo raiška buvo žemesnė nei kontrolinėse NB4 ląstelėse (4.4.2.1 pav.). ŪPL ksenograftinių pelių periferiniame kraujyje *WT1* iRNR kiekis, palyginus su kontrolinėmis pelėmis, buvo išaugęs. Pažymėtina, jog gydymas epigenetiškai veikiančiais junginiais *WT1* geno raišką sumažino 2,5 karto (4.4.1.1 lentelė). Po NB4 ląstelių, pasižyminčių aukšta *WT1* raiška, prigijimo NOG pelėse, atitinkamai išaugo ir *WT1* baltymo raiška šių pelių plaučiuose, smegenyse ir kepenyse (*WT1* baltymo kiekio padidėjimo neužregistruota inkstuose ir blužnyje). Gydymas epigenetine terapija iš dalies nuslopino *WT1* baltymo raišką minėtų organų audiniuose (4.4.2.2 pav.).

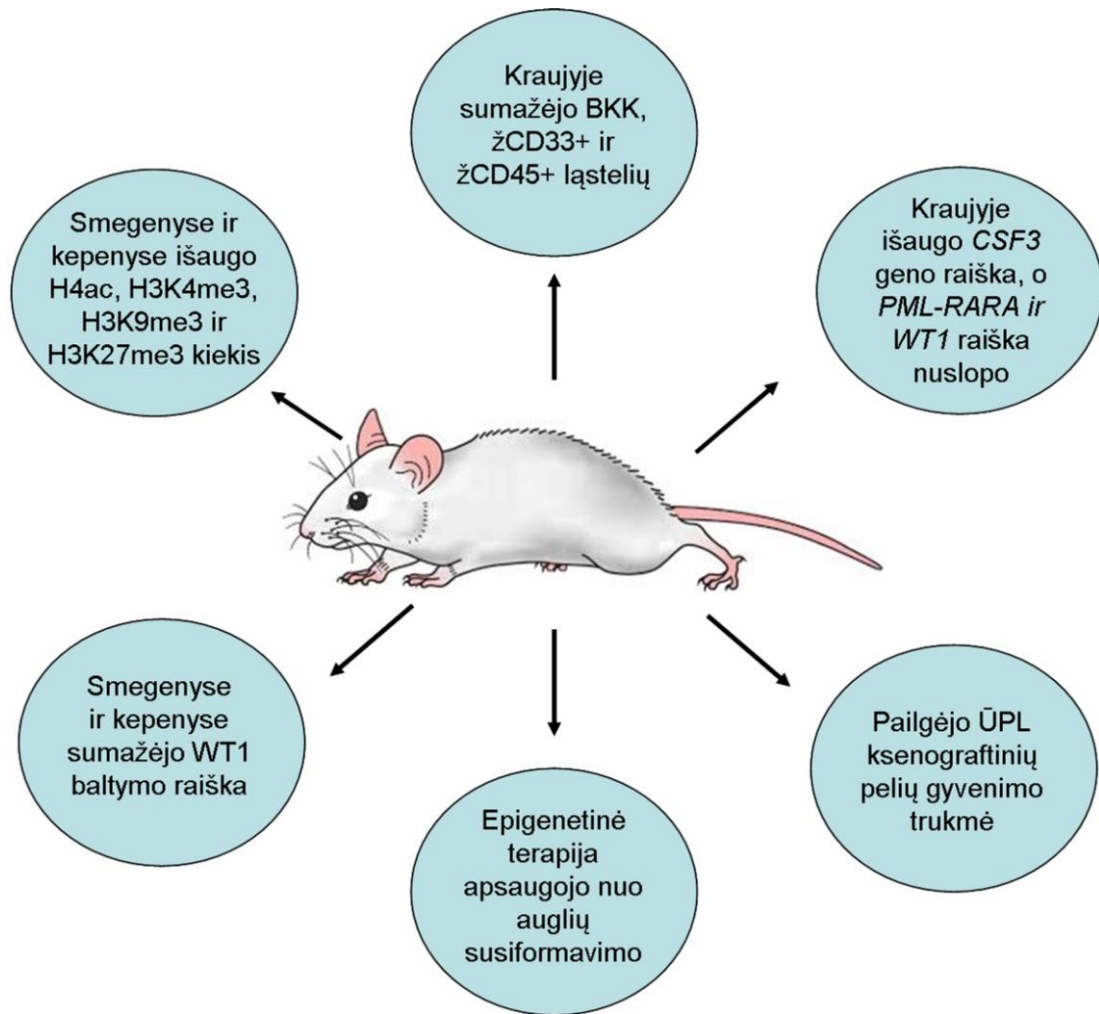
Įvertinome ir *PML-RARA* (su ŪPL patogenezė susijusio žymens) raišką ŪPL ksenograftinių pelių kraujyje. *PML-RARA* iRNR rasta ŪPL

ksenograftinių pelių kraujyje, kaip ir tikėtasi, neaptikta ŪPL ksenograftinėse pelėse, gydytose epigenetiškai veikiančiais junginiais (4.4.1.1 lentelė). Šie rezultatai sutampa su kitų grupių publikuotais darbais, nurodančiais, kad gydymas ir viena RA geba reikšmingai sumažinti *PML-RARA* geno raišką ŪPL ksenograftinėse pelėse (Patel ir kt., 2012). Visgi parodyta, kad ŪPL sergantiems pacientams, esant ir remisijos stadijai, vis vien yra būdinga *PML-RARA* raiška (Tobal ir kt., 1995). Žinoma, kad farmakologinės RA dozės indukuoja tiek proteolitinį *PML-RARα* degradavimą, tiek geba nuo *PML-RARα* atlaisvinti korepresorių/HDAC kompleksus, kurie, savo ruožtu, nutildo RA genus taikinius (Melnick ir Licht, 1999). Dėl to gydymas HDAC ar DNMT slopikliais ŪPL blastuose geba atkurti RA diferenciacinį veikimą, tiek *in vitro*, tiek *in vivo* (Warrell ir kt., 1998; Fazi ir kt., 2005; Ho ir kt., 2013). Atlikti tyrimai parodė, kad mūsų pasirinktas ksenograftų modelis gali būti sėkmingai naudojamas vertinat epigenetinių slopiklių terapinį efektyvumą.

Sergančio vėžiu ir sveiko organizmo ląstelėse bei audiniuose aptinkami skirtingi histonų epigenetiniai žymenys. Kaip žinia (Bojang ir kt., 2014), sveikose ląstelėse auglio slopiklių genų promotorinėse srityse gausu aktyvios transkripcijos žymių, tokių kaip H4ac ir H3K4me3, o satelitinėse srityse aptinkama daug slopinančių žymių – H3K9me3 ir H3K27me3. Vėžio ląstelėse vyksta epigenetiniai pokyčiai, kurių metu prarandamos slopinančios žymės satelitinėse srityse, o auglio supresorių genų promotorinėse srityse drastiškai sumažėja histonų acetilinimo lygis ir atsiranda slopinančių žymių H3K9me3 ir H3K27me3. Anksčiau atlikti tyrimai (Grigoryev ir kt., 2006) parodė, kad suaugusių pelių somatiniuose audiniuose dažniausiai yra aptinkama modifikacija H3K9me3. Taip pat parodyta, kad pagrindinį vaidmenį, kompaktizuojant chromatiną į heterochromatiną (ši chromatino struktūra tipiška somatiniams audiniams), atlieka histonų deacetilinimas.

Šio tyrimo metu įvertinome epigenetinės terapijos įtaką histonų modifikacijų pokyčiams ŪPL ksenograftinių pelių augliuose ir audiniuose. Parodėme, kad ŪPL ksenograftinių pelių augliuose H3K4me3 ir H3K9me3 modifikacijų kiekis yra aukštesnis nei NB4 ląstelėse, o H4Ac ir H3K27me3

kiekis yra žemesnis (4.4.3.1 pav.). Palyginus su kontrolinėmis NOG pelėmis, ŪPL ksenograftinėse NOG pelėse epigenetinių modifikacijų, tiek aktyvuojančių, tiek slopinančių genų raišką, lygis sumažėjo plaučiuose, blužnyje (išskyrus H3K4me3) ir inkstuose (išskyrus H3K9me3), o po ksenograftinių pelių gydymo epigenetiškai veikiančiais junginiais šių modifikacijų lygis sumažėjo dar stipriau (4.4.3.2 pav.). Ryškiausi pakitimai užfiksuoti plaučiuose – juose ne tik stipriausiai sumažėjo H4ac, H3K4me3, H3K9me3 bei H3K27me3 modifikacijų lygis, tačiau stipriai padidėjo ir WT1 baltymo raiška (4.4.2.2 pav.). ŪPL ksenograftinių pelių smegenyse visų tirtų modifikacijų lygis buvo žemesnis nei kontrolėje, tačiau po ŪPL ksenograftinių pelių gydymo epigenetine terapija abiejų aktyvuojančių žymių, ir ypač slopinančios H3K9me3 žymės, kiekis stipriai padidėjo (4.4.3.2 pav.). Įdomu tai, jog tirtų epigenetinių žymenų (išskyrus H4ac) lygis labiausiai išaugo ŪPL ksenograftinių pelių kepenyse (4.4.3.2 pav.). Pažymėtina, kad ŪPL ksenograftinių pelių kepenys pasižymėjo ir itin stipria WT1 baltymo raiška, kuri šiek tiek nuslopo po gydymo DZNep, Bel ir RA (4.4.2.2 pav.). Reikėtų pridurti, kad po poveikio epigenetiškai veikiančiais junginiais ŪPL ksenograftinių pelių kepenyse pakito ne tik WT1 baltymo raiška, tačiau pastebėtas ir histonų H4ac, H3K4me3, H3K9me3 bei H3K27me3 modifikacijų kiekio išaugimas. Tai gali būti siejama su kepenų funkcija, jų atsaku į ŪPL ląstelių infiltraciją ar taikomą gydymą. Glausta epigenetinės terapijos įtakos ŪPL ksenograftinėms pelėms schema pateikta 4.4.4.1 pav.



4.4.4.1 pav. Apibendrinta epigenetinės terapijos įtakos ŪPL ksenograftinėms pelėms schema. Nurodyti užregistruoti pokyčiai po ŪPL ksenograftinių pelių gydymo DZNep, Bel ir RA (pagal Valiulienė ir kt., 2016).

Apibendrinus, galima pasakyti, jog šiuo darbu pirmą kartą pademonstravome, kad ŪPL ksenograftinių pelių augliuose ir audiniuose yra aptinkamos įvairios epigenetinės modifikacijos, atitinkamai parodančios, kaip kinta suaugusio, vėžiu sergančio, organizmo epigenetika ir kokią įtaką epigenetiniams pokyčiams audiniuose turi gydymas epigenetiškai aktyviais junginiais.

5. IŠVADOS

1. Nustatyta, kad poveikiai HMT slopikliais BIX-01294 ir 3-deazaneplanocinu A bei HDAC slopikliu belinostatu slopina ŪPL ląstelių augimą ir gyvybingumą, o kombinuoti BIX-01294, belinostato ir 3-deazaneplanocino A poveikiai sustiprina RA indukuotą granulocitinę diferenciaciją.
2. Parodyta, jog tiek pavienių epigenetinių modifikatorių slopiklių (BIX-01294, 3-deazaneplanocino A bei belinostato), tiek kombinuoti poveikiai su RA sumažina ŪPL ląstelių genų ir jų koduojamų baltymų, susijusių su chromatinu pertvarkymu (*SUZ12*, *EED*, *EZH2*, *HDAC1*, *HDAC2*), raišką ir padidina raišką genų ir jų koduojamų baltymų, susijusių su ląstelės ciklu (*CDKN1B*) bei diferenciacija (*CEBPE*, *PPARG*).
3. Pastebėta, kad po poveikio pavieniais junginiais (BIX-01294, 3-deazaneplanocinu A bei belinostatu) padidėja chromatiną aktyvuojančių histonų modifikacijų (histono H4Ac) ir sumažėja slopinančių (H3K9me2, H3K9me3 ir H3K27me3) modifikacijų. Paveikus kombinuotais poveikiais, šios tendencijos sustiprėja.
4. ŪPL ląstelėse randama hiperacetilinto histono H4 sąsaja su genų transkripcijos ir transliacijos procesuose dalyvaujančiais baltymais, o po poveikio belinostatu užfiksuojama hiperacetilinto histono H4 sąveika su baltymais, reikalingais apoptoziniam atsakui, apsaugai nuo oksidacinio streso bei retinoinės rūgšties signalinių kelių baltymais.
5. Parodyta, kad epigenetinė terapija apsaugo ŪPL ksenograftines NOG peles nuo auglių susiformavimo bei prailgina šių pelių išgyvenimo trukmę. Gydytas tirtais epigenetiškai veikiančiais junginiais turi įtakos ŪPL ksenograftinių pelių audinių epigenetiniams pakitimams.

6. REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas

1. **Valiulienė G**, Stirblytė I, Jasnauskaitė M, Borutinskaitė V, Navakauskienė R. Anti-leukemic effects of HDACi Belinostat and HMTi 3-Deazaneplanocin A on human acute promyelocytic leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2017; 799:143–53.
2. **Valiulienė G**, Treigyte G, Savickienė J, Matuzevičius D, Alksnė M, Jarašienė-Burinskaja R, Bukelskienė V, Navakauskas D, Navakauskienė R. Histone modifications patterns in tissues and tumours from acute promyelocytic leukemia xenograft model in response to combined epigenetic therapy. *Biomed Pharmacother.* 2016; 79:62–70.
3. **Valiulienė G**, Stirblyte I, Cicenaitė D, Kaupinis A, Valius M, Navakauskiene R. Belinostat, a potent HDACi, exerts antileukaemic effect in human acute promyelocytic leukaemia cells via chromatin remodelling. *J Cell Mol Med.* 2015; 19(7):1742–55.
4. Savickiene J, Treigyte G, Stirblyte I, **Valiulienė G**, Navakauskiene R. Euchromatic histone methyltransferase 2 inhibitor, BIX-01294, sensitizes human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells to growth inhibition and differentiation. *Leuk Res.* 2014; 38(7):822–9.
5. Savickiene J, Treigyte G, **Valiulienė G**, Stirblyte I, Navakauskiene R. Epigenetic and molecular mechanisms underlying the antileukemic activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat in human acute promyelocytic leukemia cells. *Anticancer Drugs.* 2014; 25(8):938–49.

**Disertacijos rengimo metu išleistų, su disertacijos tema nesusijusių,
publikacijų sąrašas**

1. Savickiene J, Treigyte G, Baronaite S, **Valiulienė G**, Kaupinis A, Valius M, Arlauskienė A, Navakauskienė R. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature, and Proteome Analysis. *Stem Cells Int.* 2015; 2015:319238.
2. Karpavičienė I, **Valiulienė G**, Raškevičius V, Lebedytė I, Brukštus A, Kairys V, Navakauskienė R, Čikotienė I. Synthesis and antiproliferative activity of α -branched α,β -unsaturated ketones in human hematological and solid cancer cell lines. *Eur J Med Chem.* 2015; 98:30–48.
3. Valiulis V, Gerulskis G, Dapsys K, **Vistartaite G**, Siurkute A, Maciulis V. Electrophysiological differences between high and low frequency rTMS protocols in depression treatment. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2012; 72(3):283–95.

Pranešimai mokslinėse konferencijose

1. **Valiulienė G**, Navakauskienė R. „Promyelocytic leukemia therapy possibilities using epigenetic and immunotherapy approach: in vitro and in vivo studies“. „COST Action CM1106 3rd Working Group Meeting on Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells“, Atėnai, Graikija, kovo 26–27 d., 2015 (stendinis pranešimas).
2. **Valiulienė G**, Navakauskienė R. „Effect of HMTI 3-DZNeplanocin A and HDACi Belinostat in modulating gene expression and protein levels in human promyelocytic leukemia cells“. XIII-oji tarptautinė LBD konferencija, Birštonas, birželio 18–20 d., 2014 (stendinis pranešimas).

3. **Valiulienė G**, Stirblytė I, Navakauskienė R. „Histone deacetylase inhibitor Belinostat epigenetically contributes to gene expression and protein profiling alterations in human promyelocytic leukemia NB4 cells”. „EMBO/FEBS lecture course on Nuclear Proteomics”, Koso sala, Graikija, gegužės 17–22 d., 2014 (stendinis pranešimas).
4. **Valiulienė G**. „Histonų metiltransferazių slopiklio 3-Deazaneplanocino A ir histonų deacetilazių slopiklio Belinostato kombinacijoje su retinoine rūgštimi įtaka žmogaus ūminės promielocitinės leukemijos NB4 ląstelių granulocitinei diferenciacijai”. LMA 2013 JMK konferencija “Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos”, Vilnius, vasario 11 d., 2014 (žodinis pranešimas).
5. **Vištartaitė G**, Savickienė J, Treigyte G, Navakauskienė R. „HDACi Belinostat and HMTi 3-Deazaneplanocin A in combination with retinoic acid promotes human promyelocytic leukemia NB4 cells granulocytic differentiation”. „EMBO Conference Series on Chromatin and Epigenetics”, Haidelbergas, Vokietija, gegužės 08–12 d., 2013 (stendinis pranešimas).
6. **Vištartaitė G**, Savickienė J, Treigyte G, Navakauskienė R. „Effects of HDACi belinostat and HMTI 3-Deazaneplanocin A in combination with retinoic acid on human promyelocytic leukemia NB4 cells”. Lietuvos biochemikų draugijos XII konferencija „Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų”, Tolieja (Molėtų raj.), birželio 28–30 d., 2012 (stendinis pranešimas).
7. **Vištartaitė G**, Savickienė J, Treigyte G, Navakauskienė R. „Effects of diverse HDACis and HMTi 3-Deazaneplanocin A in combination with retinoic acid on human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells”. „FEBS Advanced Lecture Course Sofia school of protein science: structure and dynamics of biological molecules”, Sofija, Bulgarija, rugsėjo 09–14 d., 2012 (stendinis pranešimas).

8. **Vištartaitė G**, Savickienė J, Treigyte G, Navakauskienė R. „Effects of diverse HDACIs and HMTI 3-Deazaneplanocin A in combination with retinoic acid on human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells”. Mokslinė konferencija „Biochemija ir biofizika Vilniaus universitete”, Vilnius, rugsėjo 29 d., 2012 (stendinis pranešimas).

FINANSINĖ PARAMA

Mokslinį tyrimą finansavo Lietuvos mokslo taryba remdama projektus pagal Nacionalines mokslo programas „Lėtinės neinfekcinės ligos“ (Sut. Nr. LIG-06/2012) ir „Sveikas senėjimas“ (Sut. Nr. SEN-12/2015).

7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdalkader L, Oka T, Takata K, Sato H, Murakami I, Otte AP, *ir kt.* Aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms. *Pathology*. 2016; 48(5):467–82.
2. Ablain J, de Thé H. Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer*. 2014; 135(10):2262–72.
3. Ahuja N, Sharma AR, Baylin SB. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annu Rev Med*. 2016; 67:73–89.
4. Aird F, Kandela I, Mantis C. Replication Study: BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Elife*. 2017; 6. pii: e21253.
5. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med*. 2001; 7:680–6.
6. Andriani GA, Almeida VP, Faggioli F, Mauro M, Tsai WL, Santambrogio L, *ir kt.* Whole Chromosome Instability induces senescence and promotes SASP. *Sci Rep*. 2016; 6:35218.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, *ir kt.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391–405.
8. Arnaudo AM, Garcia BA. Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics Chromatin*. 2013; 6(1):24.
9. Arteaga MF, Mikesch JH, Fung TK, So CW. Epigenetics in acute promyelocytic leukaemia pathogenesis and treatment response: a TRAnSition to targeted therapies. *Br J Cancer*. 2015; 112(3):413–8.
10. Auclair G, Borgel J, Sanz LA, Vallet J, Guibert S, Dumas M, *ir kt.* EHMT2 directs DNA methylation for efficient gene silencing in mouse embryos. *Genome Res*. 2016; 26(2):192–202.
11. Avellino R, Delwel R. Expression and regulation of C/EBP α in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood*. 2017; 129(15):2083–91.
12. Baylin SB. The cancer epigenome: its origins, contributions to tumorigenesis, and translational implications. *Proc Am Thorac Soc*. 2012; 9(2):64–5.
13. Bannister AJ, Kouzarides T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*. 1996; 384(6610):641–3.
14. Binda O. On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics*. 2013; 8(5):457–63.
15. Blanco JCG, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, *ir kt.* The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev*. 1998; 12:1638–51.
16. Blattmann C, Oertel S, Thiemann M, Dittmar A, Roth E, Kulozik AE, *ir kt.* Histone deacetylase inhibition sensitizes osteosarcoma to heavy ion radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2015; 10:146.
17. Boisset JC, Robin C. On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. *Stem Cell Res*. 2012; 8(1):1–13.
18. Bojang P Jr, Ramos KS. The promise and failures of epigenetic therapies for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2014; 40(1):153–69.
19. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3(7):730–7.
20. Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. *Pharmacol Ther*. 2014; 143:323–36.
21. Brechard S, Plancon S, Tschirhart EJ. New Insights into the Regulation of Neutrophil NADPH Oxidase Activity in the Phagosome: A Focus on the Role of Lipid and Ca²⁺ Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18:661–76.

22. Brieger J, Weidmann E, Fenchel K, Mitrou PS, Hoelzer D, Bergmann L. The expression of the Wilms' tumor gene in acute myelocytic leukemias as a possible marker for leukemic blast cells. *Leukemia*. 1994; 8(12):2138–43.
23. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Bowen D, Kell J, Knapper S, *ir kt*. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015; 16(13):1295–305.
24. Campbell P, Thomas CM. Belinostat for the treatment of relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma. *J Oncol Pharm Pract*. 2017; 23(2):143–7.
25. Cao C, Vasilatos SN, Bhargava R, Fine JL, Oesterreich S, Davidson NE, *ir kt*. Functional interaction of histone deacetylase 5 (HDAC5) and lysine-specific demethylase 1 (LSD1) promotes breast cancer progression. *Oncogene*. 2017; 36(1):133–45.
26. Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*. 2004; 14(2):155–64.
27. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004; 23:2825–37.
28. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, Zhu H, Schott B, Fang J. *ir kt*. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 1999; 18:4808–18.
29. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, *ir kt*. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. 1997; 90:569–80.
30. Cheng X. Structural and Functional Coordination of DNA and Histone Methylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(8): a018747.
31. Cho HS, Kelly JD, Hayami S, Toyokawa G, Takawa M, Yoshimatsu M, *ir kt*. Enhanced expression of EHMT2 is involved in the proliferation of cancer cells through negative regulation of SIAH1. *Neoplasia*. 2011; 13(8):676–84.
32. Coller HA. Is cancer a metabolic disease? *Am J Pathol*. 2014; 184(1):4–17.
33. Collins J. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. 1987; 70(5):1233–44.
34. Croce LD. Chromatin modifying activity of leukemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet*. 2005; 14:77–84.
35. Crump NT, Hazzalin CA, Bowers EM, Alani RM, Cole PA, Mahadevan LC. Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionarily conserved and mediated by p300/CBP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(19):7814–9.
36. Cui J, Sun W, Hao X, Wei M, Su X, Zhang Y, *ir kt*. EHMT2 inhibitor BIX-01294 induces apoptosis through PMAIP1-USP9X-MCL1 axis in human bladder cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2015; 15(1):4.
37. Dai Y, Chen S, Wang L, Pei XY, Kramer LB, Dent P, *ir kt*. Bortezomib interacts synergistically with belinostat in human acute myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia cells in association with perturbations in NF- κ B and Bim. *Br J Haematol*. 2011; 153:222–35.
38. Damaskos C, Valsami S, Spartalis E, Antoniou EA, Tomos P, Karamaroudis S, *ir kt*. Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Therapeutic Weapon Against Medullary Thyroid Cancer? *Anticancer Res*. 2016; 36(10):5019–24.
39. Darrah E, Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Front Immunol*. 2013; 3:428.
40. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150(1):12–27.
41. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. *Expert Rev Hematol*. 2014; 7(3):347–57.
42. Diyabalanage HV, Granda ML, Hooker JM. Combination therapy: histone deacetylase inhibitors and platinum-based chemotherapeutics for cancer. *Cancer Lett*. 2013; 329(1):1–8.

43. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2004; 114(8):1117–27.
44. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol.* 2010; 11(7):585–93.
45. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* 2012; 10(2):120–36.
46. DuPage M, Chopra G, Quiros J, Rosenthal WL, Morar MM, Holohan D, *ir kt.* The chromatin-modifying enzyme Ezh2 is critical for the maintenance of regulatory T cell identity after activation. *Immunity.* 2015; 42(2):227–38.
47. Fazi F, Travaglini L, Carotti D, Palitti F, Diverio D, Alcalay M, *ir kt.* Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2005; 24(11):1820–30.
48. Feng R, Oton A, Mapara MY, Anderson G, Belani C, Lentzsch S. The histone deacetylase inhibitor, PXD101, potentiates bortezomib-induced anti-multiple myeloma effect by induction of oxidative stress and DNA damage. *Br J Haematol.* 2007; 139:385–97.
49. Fisher ML, Adhikary G, Grun D, Kaetzl DM, Eckert RL. The Ezh2 polycomb group protein drives an aggressive phenotype in melanoma cancer stem cells and is a target of diet derived sulforaphane. *Mol Carcinog.* 2016; 55(12):2024–36.
50. Fiskus W, Pranpat M, Balasis M, Herger B, Rao R, Chinnaiyan A, *ir kt.* Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(12):3096–104.
51. Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SG, Liu K, *ir kt.* Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia.* 2014; 28(11):2155–64.
52. Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A, *ir kt.* Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood.* 2009; 114(13):2733–43.
53. Flynn EM, Huang OW, Poy F, Oppikofer M, Bellon SF, Tang Y, *ir kt.* A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and Crotonyllysine Histone Peptide Modifications. *Structure.* 2015; 23(10):1801–14.
54. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, *ir kt.* Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005; 37(4):391–400.
55. Friedman AD, Keefer JR, Kummalue T, Liu H, Wang QF, Cleaves R. Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein α . *Blood Cells Mol Di.* 2003; 31:338–41.
56. Friedman AD. C/EBP α in normal and malignant myelopoiesis. *Int J Hematol.* 2015; 101(4):330–41.
57. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, *ir kt.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007; 176:231–41.
58. Fung TK, So CW. Overcoming treatment resistance in acute promyelocytic leukemia and beyond. *Oncotarget.* 2013; 4(8):1128–9.
59. Galdieri L, Vancura A. Acetyl-CoA carboxylase regulates global histone acetylation. *J Biol Chem.* 2012; 287:23865–76.
60. Gallagher RE. Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 2002; 16:1940–58.
61. Gan Q, Huang J, Zhou R, Niu J, Zhu X, Wang J, *ir kt.* PPAR γ accelerates cellular senescence by inducing p16INK4 α expression in human diploid fibroblasts. *J Cell Sci.* 2008; 121:2235–45.
62. Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, Ferrajoli A, Cortes J, Wierda WG, *ir kt.* Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic

- acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008; 111(3):1060–6.
63. Giles F, Fischer T, Cortes J, Garcia-Manero G, Beck J, Ravandi F, *ir kt*. A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:4628–35.
64. Girard N, Bazille C, Lhuissier E, Benateau H, Llombart-Bosch A, Boumediene K, *ir kt*. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, induces apoptosis and reduces cell migration in chondrosarcoma cells. *PLoS One*. 2014; 9(5):e98176.
65. Gojo I, Jiemjit A, Trepel JB, Sparreboom A, Figg WD, Rollins S, *ir kt*. Phase 1 and pharmacologic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias. *Blood*. 2007; 109(7):2781–90.
66. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, *ir kt*. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res*. 2006; 66(12):6361–9.
67. Görgens A, Radtke S, Möllmann M, Cross M, Dürig J, Horn PA, *ir kt*. Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages. *Cell Rep*. 2013; 3(5):1539–52.
68. Grassadonia A, Cioffi P, Simiele F, Iezzi L, Zilli M, Natoli C. Role of Hydroxamate-Based Histone Deacetylase Inhibitors (Hb-HDACIs) in the Treatment of Solid Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2013; 5(3):919–42.
69. Grignani F, Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, *ir kt*. Fusion proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*. 1998; 391:815–8.
70. Grigoryev SA, Bulynko YA, Popova EY. The end adjusts the means: heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. *Chromosome Res*. 2006; 14(1):53–69.
71. Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, *ir kt*. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer*. 2011; 128(3):574–86.
72. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 2004; 59(2):177–89
73. Hamamoto R, Nakamura Y. Dysregulation of protein methyltransferases in human cancer: An emerging target class for anticancer therapy. *Cancer Sci*. 2016; 107(4):377–84.
74. Han L, Zhou R, Niu J, McNutt MA, Wang P, Tong T. SIRT1 is regulated by a PPAR $\{\gamma\}$ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38:7458–71.
75. Hatzimichael E, Crook T. Cancer epigenetics: new therapies and new challenges. *J Drug Deliv*. 2013; 2013:529312.
76. Havas AP, Rodrigues KB, Bhakta A, Demirjian JA, Hahn S, Tran J, *ir kt*. Belinostat and vincristine demonstrate mutually synergistic cytotoxicity associated with mitotic arrest and inhibition of polyploidy in a preclinical model of aggressive diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Biol Ther*. 2016; 17(12):1240–52.
77. Heerboth S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Rollinson S, Sarkar S. Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genet Epigenet*. 2014; 6:9–19.
78. Hihara S, Pack CG, Kaizu K, Tani T, Hanafusa T, Nozaki T, *ir kt*. Local nucleosome dynamics facilitate chromatin accessibility in living mammalian cells. *Cell Rep*. 2012; 2(6):1645–56.
79. Hinchcliffe EH, Sluder G. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev*. 2001; 15:1167–81.
80. Ho AS, Turcan S, Chan TA. Epigenetic therapy: use of agents targeting deacetylation and methylation in cancer management. *Onco Targets Ther*. 2013; 6:223–32.
81. Horikoshi M. Histone acetylation: from code to web and router via intrinsically disordered regions. *Curr Pharm Des*. 2013;19(28):5019–42.

82. Hua F, Sun J, Guo F, Yin S, Zhang Q, Zhang W, *ir kt*. Effect of downregulated histone deacetylase 2 expression on cell proliferation and cell cycle in cervical cancer. *J BUON*. 2014; 19(2):497–501.
83. Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, *ir kt*. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ*. 2005;12(4):395–404.
84. Huang PH, Chen CH, Chou CC, Sargeant AM, Kulp SK, Teng CM, *ir kt*. Histone deacetylase inhibitors stimulate histone H3 lysine 4 methylation in part via transcriptional repression of histone H3 lysine 4 demethylases. *Mol Pharmacol*. 2011; 79(1):197–206.
85. Iriyama N, Yuan B, Yoshino Y, Hatta Y, Horikoshi A, Aizawa S, *ir kt*. Enhancement of differentiation induction and upregulation of CCAAT/enhancer-binding proteins and PU.1 in NB4 cells treated with combination of ATRA and valproic acid. *Int J Oncol*. 2014; 44:865–73.
86. Islam AB, Richter WF, Jacobs LA, Lopez-Bigas N, Benevolenskaya EV. Co-regulation of histone-modifying enzymes in cancer. *PLoS One*. 2011; 6(8):e24023.
87. Yang XJ. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioEssays*. 2004; 26:1076–87.
88. Yang XP, Jiang K, Hirahara K, Vahedi G, Afzali B, Sciume G, *ir kt*. EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci Rep*. 2015; 5:10643.
89. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, *ir kt*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenesis in human leukemia NB4 cells. *Dev Growth Differ*. 2006; 48(3):177–88.
90. Yen A. HL-60 cells as a model of growth control and differentiation: the significance of variant cells. *Hematol Rev*. 1989; 4:5–46.
91. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, *ir kt*. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012; 18:1386–93.
92. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(1):37–50.
93. Yoon JH, Kim HJ, Kwak DH, Park SS, Jeon YW, Lee SE, *ir kt*. High WT1 expression is an early predictor for relapse in patients with acute promyelocytic leukemia in first remission with negative PML-RARa after anthracycline-based chemotherapy: a single-center cohort study. *J Hematol Oncol*. 2017; 10:30.
94. You JS, Han JH. Targeting components of epigenome by small molecules. *Arch Pharm Res*. 2014; 37(11):1367–74.
95. Young AR, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep*. 2009; 10(3):228–30.
96. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009; 16:1438–44.
97. Yuan H, Marmorstein R. Histone acetyltransferases: Rising ancient counterparts to protein kinases. *Biopolymers*. 2013; 99(2):98–111.
98. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26:753–60.
99. Kamashev D, Vitoux D, De Thé H. PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *J Exp Med*. 2004; 199(8):1163–74.
100. Kawamoto H, Ikawa T, Masuda K, Wada H, Katsura Y. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev*. 2010; 238(1):23–36.
101. Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J*. 2005; 19:467–9.

102. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13(6):394.
103. Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, *ir kt.* Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J.* 2008; 409(2):581–9.
104. Kim ES. Enasidenib: First Global Approval. *Drugs.* 2017; 77(15):1705–11.
105. Kim Y, Kim YS, Kim DE, Lee JS, Song JH, Kim HG, *ir kt.* BIX-01294 induces autophagy-associated cell death via EHMT2/G9a dysfunction and intracellular reactive oxygen species production. *Autophagy.* 2013; 9(12):2126–39.
106. Kim TK, Gore SD, Zeidan AM. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions. *Semin Hematol.* 2015; 52(3):172–83.
107. Kirschbaum MH, Foon KA, Frankel P, Ruel C, Pulone B, Tuscano JM, *ir kt.* A phase 2 study of belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia or patients over the age of 60 with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a California Cancer Consortium Study. *Leuk Lymphoma.* 2014; 55(10):2301–4.
108. Klose RJ, Zhang Y. Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(4):307–18.
109. Kondo Y, Shen L, Ahmed S, Bumber Y, Sekido Y, Haddad BR, *ir kt.* Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One.* 2008; 3(4):e2037.
110. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, *ir kt.* Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res.* 2007; 37(11):974–83.
111. Konig MF, Andrade F. A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination. *Front Immunol.* 2016; 7:461.
112. Kosugi H, Ito M, Yamamoto Y, Towatari M, Ito M, Ueda R, *ir kt.* In vivo effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on human acute promyelocytic leukemia in NOD / Shisid/scid mice. *Jpn J Cancer Res.* 2001; 92(5):529–36.
113. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128:693–705.
114. Kuo MH, Allis D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays.* 1998; 20:615–26.
115. Kusaczuk M, Krętowski R, Stypułkowska A, Cechowska-Pasko M. Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor - belinostat - in glioblastoma cell lines: a preliminary report. *Invest New Drugs.* 2016; 34:552–64.
116. Lancrin C, Sroczynska P, Serrano AG, Gandillet A, Ferreras C, Kouskoff V, *ir kt.* Blood cell generation from the hemangioblast. *J Mol Med (Berl).* 2010; 88(2):167–72.
117. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT¹, Garraway LA, Golub TR, *ir kt.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 2014; 505(7484):495–501.
118. Lazarus MB, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature.* 2011; 469(7331):564–7.
119. Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev.* 2005; 26(2):147–70.
120. Lékstrom-Himes JA. The role of C/EBP (epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells.* 2001; 19:125–133.
121. Leonhardt H, Hake SB. Histone glutamine methylation affACTing rDNA transcription. *Cell Res.* 2014; 24(3):261–2.
122. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, *ir kt.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998; 396:580–4.
123. Li X, Yang H, Huang S, Qiu Y. Histone deacetylase 1 and p300 can directly associate with chromatin and compete for binding in a mutually exclusive manner. *PLoS One.* 2014; 9:e94523.

124. Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev.* 2006; 30:481–90.
125. Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schüle R, Buettner R, *ir kt.* Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis.* 2010; 31(3):512–20.
126. Lindstedt I, Lindgren MA, Andersson E, Engström W. The WT1 gene-its role in tumorigenesis and prospects for immunotherapeutic advances. *In Vivo.* 2014; 28(5):675–81.
127. Liu F, Gu L, Cao Y, Fan X, Zhang F, Sang M. Aberrant overexpression of EZH2 and H3K27me3 serves as poor prognostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma patients. *Biomarkers.* 2016; 21(1):80–90.
128. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity.* 1996; 5(5):491–501.
129. Lo Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, *ir kt.* Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 369(2):111–21.
130. Lo Coco F, Cicconi L. History of acute promyelocytic leukemia: a tale of endless revolution. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011; 3(1):e2011067.
131. Lo Coco F, Nervi C, Avvisati G, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: curable disease. *Leukemia.* 1998; 12:1866–80.
132. Lowenberg, B., Downing, J.R. Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1051–62.
133. Lu M, Kwan T, Yu C, Chen F, Freedman B, Schafer JM, *ir kt.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists promote TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels via cyclin D3 repression and cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 2005; 280:6742–51.
134. Lu Z, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Godley LA, Raj JU, *ir kt.* Histone-lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion, and DNA methylation of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs.* 2013; 24(5):484–93.
135. Machado EA, Gerard DA, Lozzio CB, Lozzio BB, Mitchell JR, Golde DW. Proliferation and differentiation of human myeloid leukemic cells in immunodeficient mice: electron microscopy and cytochemistry. *Blood.* 1984; 63(5):1015–22.
136. Maeshima K, Ide S, Hibino K, Sasai M. Liquid-like behavior of chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 2016; 37:36–45.
137. Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, *ir kt.* Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev.* 2005; 25(3):261–309.
138. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD Jr, *ir kt.* CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell.* 2009; 138(2):286–99.
139. Marmorstein R, Zhou MM. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6:a018762.
140. Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Zlobec I, Perren A, Friis R, *ir kt.* ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. *Nat Commun.* 2013; 4:2130–44.
141. Mazza M, Pelicci PG. Is PML a Tumor Suppressor? *Front Oncol.* 2013; 3:174.
142. McKeown MR, Bradner JE. Therapeutic strategies to inhibit MYC. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4(10). pii: a014266.
143. Mehdipour P, Santoro F, Botrugno OA, Romanenghi M, Pagliuca C, Matthews GM *ir kt.* HDAC3 activity is required for initiation of leukemogenesis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 2017; 31(4):995–7.
144. Melnick A, Licht J. Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1999; 93(10):3167–215.
145. Merzviniskyte R, Treigyte G, Savickiene J, Magnusson KE, Navakauskiene R. Effects of histone deacetylase inhibitors, sodium phenyl butyrate and vitamin B3, in combination

- with retinoic acid on granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1091:356–67.
146. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, Kubonishi I, Koeffler HP, Miyoshi I. Expression of the candidate Wilm's tumor gene, WT1, in human leukemia cells. *Leukemia.* 1993; 7(7):970–7.
147. Min C, Moore N, Shearstone JR, Quayle SN, Huang P, van Duzer JH, *ir kt.* Selective Inhibitors of Histone Deacetylases 1 and 2 Synergize with Azacitidine in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One.* 2017; 12(1):e0169128.
148. Monneau YR, Soufari H, Nelson CJ, Mackereth CD. Structure and activity of the peptidyl-prolyl isomerase domain from the histone chaperone Fpr4 toward histone H3 proline isomerization. *J Biol Chem.* 2013; 288(36):25826–37.
149. Morabito F, Voso MT, Hohaus S, Gentile M, Vigna E, Recchia AG, *ir kt.* Panobinostat for the treatment of acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2016; 25(9):1117–31.
150. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules.* 2015; 20:3898–941.
151. Nakagawa S, Sakamoto Y, Okabe H, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, *ir kt.* Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep.* 2014; 31(2):983–8
152. Nakajima H, Watanabe N, Shibata F, Kitamura T, Ikeda Y, Handa M. N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein *epsilon* is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation. *J Biol Chem.* 2006; 28: 14494–502.
153. Namikawa R, Ueda R, Kyoizumi S. Growth of human myeloid leukemias in the human marrow environment of SCID-hu mice. *Blood.* 1993; 82(8):2526–36.
154. Nichol JN, Dupéré-Richer D, Ezponda T, Licht JD, Miller WH Jr. H3K27 Methylation: A Focal Point of Epigenetic Dereglulation in Cancer. *Adv Cancer Res.* 2016; 131:59–95
155. Nouzova M, Holtan N, Oshiro MM, Isett RB, Munoz-Rodriguez JL, List AF, *ir kt.* Epigenomic changes during leukemia cell differentiation: analysis of histone acetylation and cytosine methylation using CpG island microarrays. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311(3):968–81.
156. Oda H, Okamoto I, Murphy N, Chu J, Price SM, Shen MM, Torres-Padilla ME, Heard E, Reinberg D. Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(8):2278–95.
157. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* 1996; 87(5):953–9.
158. Özpolat B. Acute promyelocytic leukemia and differentiation therapy: molecular mechanisms of differentiation, retinoic acid resistance and novel treatments. *Turk J Haematol.* 2009; 26(2):47–61.
159. Pan MR, Hsu MC, Chen LT, Hung WC. G9a orchestrates PCL3 and KDM7A to promote histone H3K27 methylation. *Sci Rep.* 2015; 5:18709.
160. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010; 191:677–91.
161. Park SE, Yi HJ, Suh N, Park YY, Koh JY, Jeong SY, *ir kt.* Inhibition of EHMT2/G9a epigenetically increases the transcription of Beclin-1 via an increase in ROS and activation of NF- κ B. *Oncotarget.* 2016; 7(26):39796–808.
162. Park TS, Lee ST, Kim JS, Song J, Lee KA, Kim SJ, *ir kt.* Acute promyelocytic leukemia in early pregnancy with translocation t(15;17) and variant PML/RARA fusion transcripts. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009; 188(1):48–51.
163. Patel S, Zhang Y, Cassinat B, Zassadowski F, Ferré N, Cuccuini W, *ir kt.* Successful xenografts of AML3 samples in immunodeficient NOD/shi-SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ mice. *Leukemia.* 2012; 26(11):2432–5.

164. Paz-Priel I, Friedman A. C/EBP α dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog.* 2011; 16:93–102.
165. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, Zhao L, Wei S, Wang W, *ir kt.* Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature.* 2015; 527(7577):249–53.
166. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, *ir kt.* Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 2001; 107(3):323–37.
167. Pieterse E, Hofstra J, Berden J, Herrmann M, Dieker J, van der Vlag J. Acetylated histones contribute to the immunostimulatory potential of neutrophil extracellular traps in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2015; 179(1):68–74.
168. Pires-Luís AS, Vieira-Coimbra M, Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Silva-Santos R, Dias PC, *ir kt.* Expression of histone methyltransferases as novel biomarkers for renal cell tumor diagnosis and prognostication. *Epigenetics.* 2015; 10(11):1033–43.
169. Pleyer L, Döhner H, Dombret H, Seymour JF, Schuh AC, Beach CL, *ir kt.* Azacitidine for Front-Line Therapy of Patients with AML: Reproducible Efficacy Established by Direct Comparison of International Phase 3 Trial Data with Registry Data from the Austrian Azacitidine Registry of the AGMT Study Group. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(2). pii: E415.
170. Prebet T, Vey N. Vorinostat in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20(2):287–95.
171. Puvvada SD, Li H, Rimsza LM, Bernstein SH, Fisher RI, LeBlanc M, *ir kt.* A phase II study of belinostat (PXD101) in relapsed and refractory aggressive B-cell lymphomas: SWOG S0520. *Leuk Lymphoma.* 2016; 57(10):2359–69.
172. Qiu X, Xiao X, Li N, Li Y. Histone deacetylases inhibitors (HDACis) as novel therapeutic application in various clinical diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017; 72:60–72.
173. Quintás-Cardama A, Santos FP, Garcia-Manero G. Histone deacetylase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2011; 25(2):226–35.
174. Ren A, Qiu Y, Cui H, Fu G. Inhibition of H3K9 methyltransferase G9a induces autophagy and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 459(1):10–7.
175. Sanz MA, Lo Coco F. Modern approaches to treating acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2011; 29(5):495–503.
176. Savickiene J, Borutinskaite VV, Treigyte G, Magnusson KE, Navakauskiene R. The novel histone deacetylase inhibitor BML-210 exerts growth inhibitory, proapoptotic and differentiation stimulating effects on the human leukemia cell lines. *Eur J Pharmacol.* 2006a; 549:9–18.
177. Savickiene J, Treigyte G, Borutinskaite V, Navakauskiene R, Magnusson KE. The histone deacetylase inhibitor FK228 distinctly sensitizes the human leukemia cells to retinoic acid-induced differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006b; 1091:368–84.
178. Savickiene J, Treigyte G, Borutinskaite VV, Navakauskiene R. Antileukemic activity of combined epigenetic agents, DNMT inhibitors zebularine and RG108 with HDAC inhibitors, against promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2012; 17:501–25.
179. Savickiene J, Treigyte G, Magnusson KE, Navakauskiene R. Response of retinoic acid-resistant KG1 cells to combination of retinoic acid with diverse histone deacetylase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171:321–33.
180. Savickiene J, Treigyte G, Stirblyte I, Valiuliene G, Navakauskiene R. Euchromatic histone methyltransferase 2 inhibitor, BIX-01294, sensitizes human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells to growth inhibition and differentiation. *Leuk Res.* 2014a; 38(7):822–9.
181. Savickiene J, Treigyte G, Valiuliene G, Stirblyte I, Navakauskiene R. Epigenetic and molecular mechanisms underlying the antileukemic activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat in human acute promyelocytic leukemia cells. *Anticancer Drugs.* 2014b; 25(8):938–49.

182. Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet.* 2010; 70:57-85.
183. Schaefer EW, Loaiza-Bonilla A, Juckett M, DiPersio JF, Roy V, Slack J, *ir kt.* Mayo P2C Phase II Consortium. A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2009; 94(10):1375–82.
184. Schenk T, Stengel S, Zelent A. Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy. *Br J Cancer.* 2014; 111(11):2039–45.
185. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis.* 2014; 35(3):515–27.
186. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(4):a018713.
187. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007; 76:75–100.
188. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, *ir kt.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004; 119(7):941–53.
189. Simoliūnas E, Kaliniene L, Truncaitė L, Zajančauskaitė A, Staniulis J, Kaupinis A, *ir kt.* Klebsiella phage vB_KleM-RaK2 - a giant singleton virus of the family Myoviridae. *PLoS One.* 2013; 8(4):e60717.
190. Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, *ir kt.* Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 2005; 113(4):264–8.
191. Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, *ir kt.* Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2007; 110(7):2302–8.
192. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene.* 2010; 29(15):2217–27.
193. Stahl M, Gore SD, Vey N, Prebet T. Lost in translation? Ten years of development of histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Investig Drugs.* 2016; 25(3):307–17.
194. Stapnes C, Rynningen A, Hatfield K, Øyan AM, Eide GE, Corbascio M, *ir kt.* Functional characteristics and gene expression profiles of primary acute myeloid leukaemia cells identify patient subgroups that differ in susceptibility to histone deacetylase inhibitors. *Int J Oncol.* 2007; 31:1529–38.
195. Steinberg BE, Grunstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE.* 2007; 379:pe11.
196. Sternsdorf T, Phan VT, Maunakea ML, Ocampo CB, Sohal J, Silletto A, *ir kt.* Forced retinoic acid receptor alpha homodimers prime mice for APL-like leukemia. *Cancer Cell.* 2006; 9(2):81–94.
197. Stulemeijer IJ, De Vos D, van Harten K, Joshi OK, Blomberg O, van Welsem T, *ir kt.* Dot1 histone methyltransferases share a distributive mechanism but have highly diverged catalytic properties. *Sci Rep.* 2015; 5:9824.
198. Sukhai MA, Thomas M, Xuan Y, Chan LS, Hamadanizadeh SA, Zhang T, *ir kt.* Evidence of functional interaction between NuMA-RARalpha and RXRalpha in an in vivo model of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene.* 2008; 27(34):4666–77.
199. Swygert SG, Peterson CL. Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1839(8):728–36.
200. Szanto A, Nagy L. Retinoids potentiate peroxisome proliferator-activated receptor gamma action in differentiation, gene expression, and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. *Mol Pharmacol.* 2005; 67(6):1935–43.
201. Takashina T, Kinoshita I, Kikuchi J, Shimizu Y, Sakakibara-Konishi J, Oizumi S, *ir kt.* Combined inhibition of EZH2 and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2016; 107(7):955–62.

202. Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, Daigo Y, Takagi K, Iwai Y, *ir kt*. Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci*. 2011; 102(7):1298–305.
203. Tan Y, Bian S, Xu Z, Chen X, Qi X, Ren F, *ir kt*. The short isoform of the long-type PML-RARA fusion gene in acute promyelocytic leukaemia lacks sensitivity to all-trans-retinoic acid. *Br J Haematol*. 2013; 162(1):93–7.
204. Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, *ir kt*. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev*. 2007; 21:1050–63.
205. Tan JZ, Yan Y, Wang XX, Jiang Y, Xu HE. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2014; 35(2):161–74.
206. Tessarz P, Santos-Rosa H, Robson SC, Sylvestersen KB, Nelson CJ, Nielsen ML, *ir kt*. Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature*. 2014; 505(7484):564–8.
207. Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, Moleti ML, Giona F, Vignetti M, *ir kt*. GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. *Blood*. 2005; 106(2):447–53.
208. Thiel AT, Feng Z, Pant DK, Chodosh LA, Hua X. The trithorax protein partner menin acts in tandem with EZH2 to suppress C/EBP α and differentiation in MLL-AF9 leukemia. *Haematologica*. 2013; 98, 918–927.
209. Thomas A, Rajan A, Szabo E, Tomita Y, Carter CA, Scepura B, *ir kt*. A phase I/II trial of belinostat in combination with cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide in thymic epithelial tumors: a clinical and translational study. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(21):5392–402.
210. Tickenbrock L, Klein HU, Trento C, Hascher A, Göllner S, Bäumer N, *ir kt*. Study Alliance Leukemia Group. Increased HDAC1 deposition at hematopoietic promoters in AML and its association with patient survival. *Leuk Res*. 2011; 35(5):620–5.
211. Tobal K, Saunders MJ, Grey MR, Yin JA Persistence of RAR alpha-PML fusion mRNA detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in long-term remission of acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1995; 90(3):615–8.
212. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol*. 2013; 97(6):717–25.
213. Truong BT, Lee YJ, Lodie TA, Park DJ, Perrotti D, Watanabe N, *ir kt*. CCAAT/Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003; 101:1141–8.
214. Unoki M, Masuda A, Dohmae N, Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, *ir kt*. Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6). *J Biol Chem*. 2013; 288(9):6053–62.
215. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, *ir kt*. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009; 5:e1000639.
216. Valiulienė G, Stirblytė I, Cicenaitė D, Kaupinis A, Valius M, Navakauskienė R. Belinostat, a potent HDACi, exerts antileukaemic effect in human acute promyelocytic leukaemia cells via chromatin remodelling. *J Cell Mol Med*. 2015; 19(7):1742–55.
217. Valiulienė G, Stirblytė I, Jasnauskaitė M, Borutinskaitė V, Navakauskienė R. Anti-leukemic effects of HDACi Belinostat and HMTi 3-Deazaneplanocin A on human acute promyelocytic leukemia cells. *Eur J Pharmacol*. 2017; 799:143-153.
218. Valiulienė G, Treigytė G, Savickienė J, Matuzevičius D, Alksnė M, Jarašienė-Burinskaja R, Bukelskienė V, Navakauskas D, Navakauskienė R. Histone modifications patterns in tissues and tumours from acute promyelocytic leukemia xenograft model in response to combined epigenetic therapy. *Biomed Pharmacother*. 2016; 79:62–70.
219. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, *ir kt*. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002; 419(6907):624–9.

220. Vasilatos SN, Katz TA, Oesterreich S, Wan Y, Davidson NE, Huang Y. Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013; 34(6):1196–207.
221. Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol*. 2005; 83(3):344–53.
222. Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Bégin V, Saad F, *ir kt*. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev*. 2011; 25:41–50
223. Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, Pereira A, Menezes FD, Antunes L, *ir kt*. Deregulated expression of selected histone methylases and demethylases in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2013; 21(1):51–61.
224. Vitfell-Rasmussen J, Judson I, Safwat A, Jones RL, Rossen PB, Lind-Hansen M, *ir kt*. A Phase I/II Clinical Trial of Belinostat (PXD101) in Combination with Doxorubicin in Patients with Soft Tissue Sarcomas. *Sarcoma*. 2016; 2016:2090271.
225. Vollmuth F, Geyer M. Interaction of propionylated and butyrylated histone H3 lysine marks with Brd4 bromodomains. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010; 49(38):6768–72.
226. Wada T, Kikuchi J, Nishimura N, Shimizu R, Kitamura T, Furukawa Y. Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J Biol Chem*. 2009; 284(44):30673–83.
227. Wan HJ, Lyu W, Yu L, et al. Inhibition of G9a attenuates cell proliferation via the mitochondrial apoptosis pathway in lung adenocarcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2017; 39(1):13-17.
228. Wang B, Wang XB, Chen LY, Huang L, Dong RZ. Belinostat-induced apoptosis and growth inhibition in pancreatic cancer cells involve activation of TAK1-AMPK signaling axis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 437:1–6.
229. Wang X, Huang S, Chen JL. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Mol Cancer*. 2017; 16(1):2.
230. Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics*. 2016; 8:59.
231. Warrell RP Jr, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90(21):1621–5.
232. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2007; 10:52–6.
233. Wee S, Dhanak D, Li H, Armstrong SA, Copeland RA, Sims R, *ir kt*. Targeting epigenetic regulators for cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1309:30–6.
234. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest*. 2014; 124(1):30–9.
235. Wilkinson AC, Göttgens B. Transcriptional regulation of haematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 786:187–212.
236. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M.. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009; 6:359–62.
237. Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, Fellows J, Erdjument-Bromage H, Ohba R, *ir kt*. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*. 1999; 4(1):123–8.
238. Wouters BJ, Delwel R. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016; 127(1):42–52.
239. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, *ir kt*. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*. 1999; 3(2):151–8.
240. Xie M, Jiang Q, Xie Y. Comparison between decitabine and azacitidine for the treatment of myelodysplastic syndrome: a meta-analysis with 1,392 participants. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015; 15(1):22–8.

241. Zang C, Liu H, Ries C, Ismail MG, Petrides PE. Enhanced migration of the acute promyelocytic leukemia cell line NB4 under in vitro conditions during short-term all-trans-retinoic acid treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000; 126(1):33–40.
242. Zeisig BB, Kwok C, Zelent A, Shankaranarayanan P, Gronemeyer H, Dong S, So CW. Recruitment of RXR by homotetrameric RARalpha fusion proteins is essential for transformation. *Cancer Cell*. 2007; 12(1):36–51.
243. Zhang L, Yan L, Zhang Y, Wu NH, Shen YF. Role of acetylated p53 in regulating the expression of map2 in retinoic acid-induced P19 cells. *Chin Med Sci J*. 2010; 25:71–5.
244. Zheng Y, Thomas PM, Kelleher NL. Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites. *Nat Commun*. 2013; 4:2203.
245. Zheng YG, Wu J, Chen Z, Goodman M. Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy. *Med Res Rev*. 2008; 28(5):645–87.
246. Zhou J, Bi C, Cheong LL, Mahara S, Liu SC, Tay KG, *ir kt*. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood*. 2011; 118(10):2830–9.

Duomenų bazės:

1. Klinikinių tyrimų duomenų bazė: www.clinicaltrials.gov. Paskutinį kartą naudotasi 2017 m. rugsėjo 20 d.
2. Vėžio epigenetinių vaistų duomenų bazė: Licheva M, Bennani-Baiti. Histone methyltransferase inhibitors, *Cancer Epigenetics Drug Database (CEDD) v0.1*, *Cancer Epigenetics Society* (<http://ces.b2sg.org/cedd/kdmi/>), 2016.

Internetinės MS duomenų apdorojimo svetainės:

1. Funkciniai baltymų sąsajų tinklai: string-db.org/. Paskutinį kartą naudotasi 2015 m. sausio 15 d.

Internetinės svetainės:

1. American Cancer Society. Straipsniai: „How Is Acute Myeloid Leukemia Diagnosed?“, paskutinį kartą atnaujinta 2016 m. vasario 22 d.; „Typical Treatment of Most Types of Acute Myeloid Leukemia (Except Acute Promyelocytic M3)“, paskutinį kartą atnaujinta 2016 m. vasario 22 d.; „Treatment of Acute Promyelocytic (M3) Leukemia“, paskutinį kartą atnaujinta 2016 m. vasario 22 d.
2. MedChem Express internetinis puslapis: <https://www.medchemexpress.com>. Paskutinį kartą naudotasi 2017 m. rugsėjo 20 d.
3. Medical News Today. Straipsnis „Leukemia: Causes, Symptoms and Treatments“, paskutinį kartą atnaujintas 2017 m. kovo 24 d.
4. National Cancer Institute. www.cancer.gov/types/leukemia. Atnaujinta 2014 m.
5. OncLive. Straipsnis „European Commission Expands Azacitidine Approval in AML“, paskelbtas 2015 m. rugsėjo 30 d.
6. Taconic firmos internetinis puslapis: www.taconic.com. Paskutinį kartą naudotasi 2017 m. rugsėjo 20 d.

Elektroninės knygos:

1. Guenova M., Balatzenko G. „Leukemia“. Skyriuje, redaguotame Hamid G. A. „Acute Leukemia Clinical Presentation“. Leidėjas InTech; 2013. DOI:10.5772/45914.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovei prof. dr. Rūtai Navakauskienei už galimybę dirbti Jos vadovaujamoje laboratorijoje ir atlikti šiuos tyrimus. Taip pat esu dėkinga už palaikymą, naudingus patarimus, idėjas ir šiltą bendravimą.

Noriu padėkoti ir visiems Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus darbuotojams. Ypatingą padėką norėčiau išreikšti dr. Jūratei Savickienei ir dr. Gražinai Treigytei už pasidalinimą gausia patirtimi, vertingus patarimus ir didelę pagalbą. Dėkoju prisidėjus prie šio darbo ir VU GMC Proteomikos centro mokslininkams dr. Mindaugui Valiui ir dr. Algirdui Kaupiniui. Taip pat ir VU GMC Biologinių modelių skyriaus mokslininkėms dr. Virginijai Bukelskienei, Rasai Jarašienei-Burinskajai ir Mildai Alksnei.

Esu labai dėkinga ir savo artimiesiems už begalinę kantrybę, palaikymą ir supratingumą.

Curriculum Vitae

Asmeninė informacija

Giedrė Valiulienė

+37068373422

giedre.valiuliene@bchi.vu.lt

Išsilavinimas

2011–2017: Biochemijos doktorantūra; VU GMC Biochemijos institutas, Lietuva.

2009–2011: Biologijos magistras (Neurobiologija), Magna Cum Laude; VU Gamtos mokslų fakultetas, Lietuva.

2008 08 25 – 2009 01 31: ERASMUS studijos, Kopenhagos universitetas, Danija.

2005–2009: Biologijos bakalauras (Molekulinė biologija); VU Gamtos mokslų fakultetas, Lietuva.

Kursai

2012 08 02–06. EMBL kvalifikacijos kursai "Advanced qPCR Techniques for Publication Success: Following MIQE Recommendation". Europos Molekulinės biologijos laboratorija, Haidelbergas, Vokietija.

2012 09 09–14. FEBS paskaitų ciklas ir kursai pažengusiems "Sofia school of protein science: structure and dynamics of biological molecules". Molekulinės biologijos institutas "Roumen Tsanev", Sofija, Bulgarija.

Darbo patirtis:

2012–2015: Jaunesnioji mokslo darbuotoja / tyrėja; VU Biochemijos institutas.

2007–2009: Laborantė; VU Biochemijos institutas.

Moksliniai interesai

Molekulinė biologija, vėžio vystymosi epigenetinis reguliavimas, neurobiologija.

Narystė draugijose

2011 – iki dabar: Lietuvos biochemikų draugija.