

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aida
VITKEVIČIENĖ

Žmogaus mieloidinės leukemijos
ląstelių molekulinų mechanizmų
tyrimai panaudojant naujus
epigenetinius ir metabolinius
regulatorius

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija N 004

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015-2019 metais Vilniaus universitete Gyvybės mokslų centre Biochemijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (projektas „Molekulinių veiksmų vaidmuo hematologinės sistemos reguliavime ląstelinio senėjimo, diferenciacijos ir regeneracijos metu“, SEN-12/2015; gauta Lietuvos mokslo tarybos stipendija už akademinis pasiekimus).

Mokslinė vadovė – prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkė:

dr. Virginija Bukelskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

Prof. dr. Dainius Characiejus (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

Dr. Agnė Kulytė (Karolinska institutet, Švedija, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

Prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

Doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. kovo mėn. 6 d. 13 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-101 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10527, Vilnius, Lietuva

Tel. +37052234420; el. paštas info@gmc.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Aida
VITKEVIČIENĖ

Investigation of molecular mechanisms
in human myeloid leukemia cells using
new epigenetic and metabolic
regulators

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2015 and 2019 at Vilnius University Life Sciences Center Institute of Biochemistry.

The research was supported by the Research Council of Lithuania (project “The role of molecular modulators in the hematological system during cell senescence, differentiation and regeneration“, contract No. SEN-12/2015; Research Council of Lithuania granted a scholarship for academic accomplishments).

Academic supervisor – prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Dissertation Defence Panel:

Chairperson:

Dr. Virginija Bukelskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

Prof. dr. Dainius Characiejus (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001);

Dr. Agnė Kulytė (Karolinska institutet, Sweden, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010);

Doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13 h on 6 March 2020 in the meeting room R-101 of Vilnius University Life Sciences Center.

Address: Sauletekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania

Tel. +37052234420; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	6
SANTRUMPOS	7
ĮVADAS.....	8
MEDŽIAGOS IR METODAI.....	15
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	16
1. Epigenetinių reguliatorių EGCG ir BIX-01294 poveikio ŪPL ir LML ląstelėms tyrimai	16
1.1. EGCG ir BIX-01294 slopina mieloidinės leukemijos ląstelių proliferaciją ir stabdo ląstelės ciklą.....	17
1.2. EGCG ir BIX-01294 gebėjimo sukelti apoptozę, ląstelinį senėjimą ir diferenciaciją analizė	19
1.3. EGCG ir BIX-01294 sukelia mieloidinės leukemijos ląstelių epigenetinius pokyčius	21
2. Kombinuotos epigenetinės terapijos su HDAC ir HMT slopikliais poveikio ŪPL ląstelėms įvertinimas.....	24
2.1. Kombinuoto agentų poveikio ŪPL ląstelėms analizė	26
2.2. Kombinuotas agentų poveikis sukelia epigenetinius pokyčius leukeminėse ląstelėse	28
3. Chemoterapijai atsparių ŪML ląstelių metabolizmo moduliavimo tyrimai.....	29
3.1. Gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelių energetinės būklės analizė bei jos moduliavimas oksidacinio fosforilinimo slopikliais.....	30
3.2. Molekuliniai pokyčiai gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelėse paveikus metabolizmo modulatoriais.....	31
4. Apibendrinimas	33
IŠVADOS.....	36
SUMMARY	37
REZULTATŲ VIEŠINIMAS	43
CURRICULUM VITAE	44
PADĖKA.....	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	46
UŽRAŠAMS	55

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Disertacija parengta, remiantis keturiomis publikacijomis:

1 publikacija. Borutinskaitė, V., **Virksaitė, A.**, Gudelytė, G., Navakauskienė, R., 2018. Green tea polyphenol EGCG causes anti-cancerous epigenetic modulations in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma* 59, 469–478. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1339881>

2 publikacija. **Vitkevičienė, A.**, Bakšienė, S., Borutinskaitė, V., Navakauskienė, R., 2018. Epigallocatechin-3-gallate and BIX-01294 have different impact on epigenetics and senescence modulation in acute and chronic myeloid leukemia cells. *European Journal of Pharmacology* 838, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.09.005>

3 publikacija. **Vitkevičienė, A.**, Skiauterytė, G., Žučenka, A., Stoškus, M., Gineikienė, E., Borutinskaitė, V., Griškevičius, L., Navakauskienė, R., 2019. HDAC and HMT inhibitors in combination with conventional therapy: a novel treatment option for acute promyelocytic leukemia. *Journal of Oncology* 2019, 6179573. <https://doi.org/10.1155/2019/6179573>

4 publikacija. **Vitkevičienė, A.**, Janulis, V., Žučenka, A., Borutinskaitė, V., Kaupinis, A., Valius, M., Griškevičius, L., Navakauskienė, R., 2019. Oxidative phosphorylation inhibition induces anticancerous changes in therapy-resistant-acute myeloid leukemia patient cells. *Molecular Carcinogenesis* 58, 2008-2016. <https://doi.org/10.1002/mc.23092>

Autorės indėlis: Autorė parašė antrą, trečią ir ketvirtą publikacijas, prisidėjo prie pirmos publikacijos rengimo, atliko daugelį molekulinį ir epigenetinių tyrimų, paskelbtų nurodytose publikacijose.

SANTRUMPOS

AT-kPGR	atvirkštinės transkripcijos-kiekybinė polimerazinė grandininė reakcija
BCR-ABL	sulietas baltymas, dažniausiai būdingas lėtinei mieloidinei leukemijai (angl. <i>breakpoint cluster region protein – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>)
BIX-01294	1-benzilpiperidin-4-il)-6,7-dimetoksi-2-(4-metil-1,4-diazepan-1-il)kvinazolin-4-aminas; EHMT1/G9A slopiklis
DNMT	DNR metiltransferazė
EGCG	epigalokatechin-3-galatas; plačiu biologiniu aktyvumu pasižymintis polifenolis; epigenetinių reguliatorių DNMT1 ir HDAC slopiklis
EHMT1/G9A	euchromatino histonų lizino N-metiltransferazė 1, kuri katalizuoja histono H3K9 dimetilimą (angl. <i>euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1 / G9A-like protein</i>)
HDAC	histonų deacetilazė
HMT	histonų metiltransferazė
LML	lėtinė mieloidinė leukemija
PML- RAR α	sulietas baltymas, dažniausiai būdingas ūminei promielocitinei leukemijai (angl. <i>promyelocytic leukemia protein – retinoic acid receptor α</i>)
PRC	Polycomb slopinantis kompleksas (angl. <i>Polycomb repressive complex</i>)
ŪML	ūminė mieloidinė leukemija
ŪPL	ūminė promielocitinė leukemija

ĮVADAS

Kraujas yra vienas iš geriausiai atsikuriančių ir plastiškiausių audinių organizme. Kraujyje yra daugiau nei dešimt skirtingų ląstelių rūšių, kurios organizme atlieka skirtingas funkcijas. Subrendusios kraujo ląstelės susiformuoja kaulų čiulpuose iš hematopoetinių kamieninių ląstelių hematopoezės metu (Rieger ir Schroeder, 2012). Šio proceso metu hierarchijos viršūnėje esančios hematopoetinės kamieninės ląstelės vystosi į vis mažesniu daugialiniškumo potencialu pasižyminčias ląsteles pirmtakes, kol galiausiai susiformuoja diferencijuotų subrendusių kraujo ląstelių populiacijos (1 pav.) (MacLean et al., 2017).

Hematopoezėje dalyvaujančiose ląstelėse įvykus genetiniams bei epigenetiniams pakitimams, gali išsivystyti kraujo vėžys – leukemija. Mutacijos gali įvykti tiek ankstyvose, tiek vėlyvose hematopoezės stadijose (Martinez-Climent et al., 2006). Dėl įvykusių pakitimų ląstelės ima nevaldomai daugintis, todėl leukemijai yra būdingas padidėjęs piktybinių kraujo ląstelių kiekis kraujyje ir/ar kaulų čiulpuose (Juliusson ir Hough, 2016). Piktybinės kraujo ląstelės ne tik neatlieka savo funkcijos – didelis jų kiekis ima trukdyti sveikų ląstelių funkcionavimui. Tai pasireiškia organizmo nuovargiu, karščiavimu, svorio netekimu, kaulų skausmais, kraujosruvomis ar kraujavimu (Davis et al., 2014).

Priklausomai nuo to, ar piktybiniai pakitimai įvyko mieloidinėje ar limfoidinėje linijoje, leukemija išskiriama atitinkamai į mieloidinę ar limfoidinę; pagal tai, kaip greitai vystosi – į lėtinę ar ūminę. Pastaroji, dėl spartesnio piktybinių ląstelių gausėjimo, yra pavojingesnė. Ūminės leukemijos atveju pakitusios kraujo ląstelės yra nesubrendusios ir negali atlikti funkcijų, būdingų sveikoms kraujo ląstelėms. Tuo tarpu, lėtinės leukemijos atveju dauguma ląstelių yra dalinai funkcionalios (Chen et al., 2015). Dažniausiai pasitaikantis vaikų vėžinis susirgimas yra ūminė limfoidinė leukemija. Per pastaruosius dešimtmečius šios ligos gydymas ženkliai patobulėjo ir dabar ilgalaikę remisiją pasiekia apie 90 % vaikų, tačiau suaugusiuose organizmuose, greičiausiai dėl agresyvesnės ligos biologijos, šis procentas yra kiek mažesnis (Juliusson ir Hough, 2016).

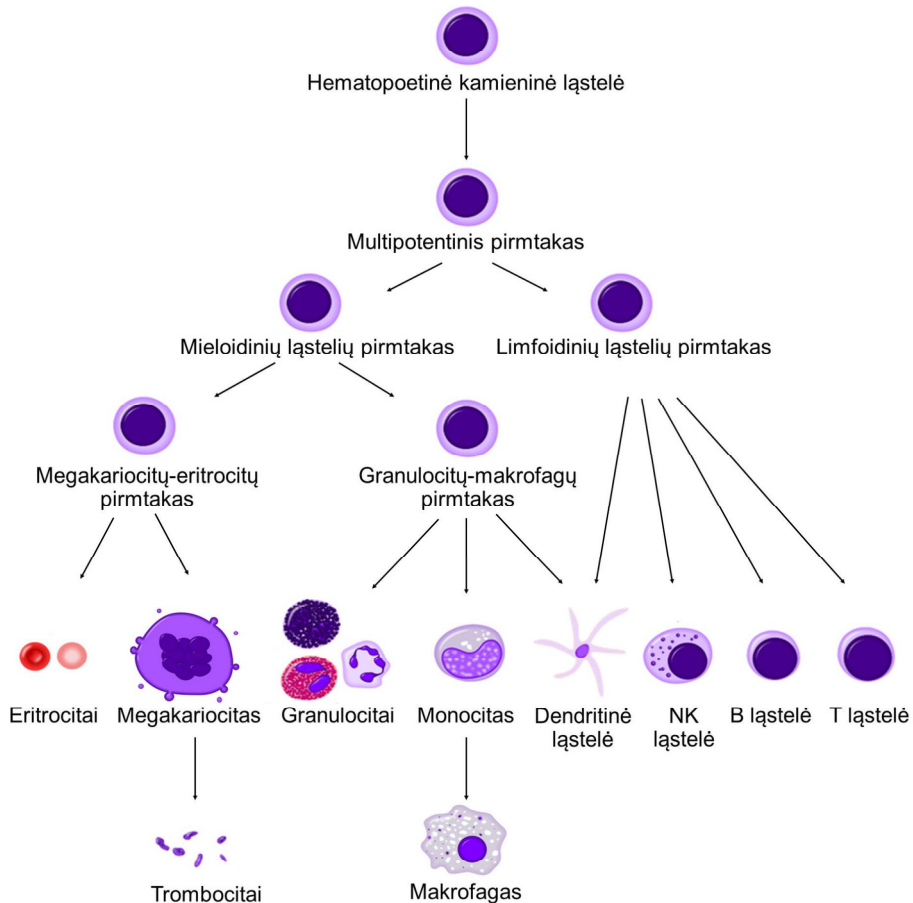
Šiame darbe buvo gilinamasi į mieloidinės leukemijos molekulinę biologiją. Tiek ūminė, tiek lėtinė mieloidinė leukemija dažniausiai pasireiškia suaugusiems asmenims, senstant tikimybė susirgti didėja (Davis et al., 2014; Juliusson ir Hough, 2016). Yra nustatoma apytiksliai 1,3 ūminės mieloidinės leukemijos (ŪML) atvejų / 100 000 žmonių, jaunesnių nei 65

metų amžiaus; tuo tarpu vyresniems nei 65 metų asmenims nustatoma apytiksliai 12,2 ŪML atvejų / 100 000 žmonių (De Kouchkovsky ir Abdul-Hay, 2016). Mieloidinė leukemija apskritai laikoma vyresnio amžiaus žmonių liga: asmenų, kuriems nustatoma ūminė mieloidinė leukemija, amžiaus mediana diagnozės metu yra apytiksliai 70 metų. Ilgėjant žmonių gyvenimo trukmei, mieloidine leukemija suserga vis daugiau žmonių (Tamamyan et al., 2017). Ši liga yra labai heterogeniška – nors įvairios mutacijos bei epigenetiniai pakitimai sukelia tuos pačius ar panašius sutrikimus, tačiau, dėl skirtingos ligos prigimties, gydymo efektyvumas taip pat būna skirtingas (Estey, 2016). Šiame darbe gilintasi į šias mieloidinės leukemijos formas: ūminę promielocitinę leukemiją (ŪPL), lėtinę mieloidinę leukemiją (LML) bei gydymui atsparią ūminę mieloidinę leukemiją (ŪML).

ŪPL yra ūminės mieloidinės leukemijos tipas, charakterizuojamas chromosomine translokacija, kurioje dalyvauja genas, koduojantis retinoinės rūgšties receptorių α (*RARA*), pavyzdžiui, *ZBTB16-RARA*, *NMP-RARA*, *NUMA-RARA*, *STAT5B-RARA* ir pan. Tačiau dažniausiai (~98 % atvejų) būdinga chromosominė translokacija t(15;17)(q22;q21) (Adams ir Nassiri, 2015). Dėl šios genetinės aberacijos susidaro sulietas PML-RAR α baltymas (angl. *promyelocytic leukemia protein – retinoic acid receptor α*), kuris blokuoja promielocitų diferenciaciją į granulocitus, todėl promielocitai proliferuoja ir kaupiasi kraujyje (Kakizuka et al., 1991; Masetti et al., 2012). Atradus, kad retinoinė rūgštis veikia PML-RAR α baltymą ir taip sukelia promielocitų diferenciaciją, ŪPL tapo gana sėkmingai išgydoma liga – šiuo metu didžioji dalis pacientų pasiekia visišką remisiją po gydymo įvairiomis retinoinės rūgšties, arseno trioksido ir chemoterapinių agentų kombinacijomis (Wang et al., 2016). Tačiau dalis ŪPL pacientų yra atsparūs gydymui retinoine rūgštimi arba tampa atsparūs pakartotinio gydymo metu. Taip pat dalis pacientų atkrenta po remisijos (Lou et al., 2015; Tomita et al., 2013).

Lėtinei mieloidinei leukemijai (LML) būdinga kita chromosominė translokacija t(9;22)(q34;q11), vadinama Filadelfijos chromosoma, dėl kurios susidaro visada aktyvi hibridinė BCR-ABL tirozino kinazė (angl. *breakpoint cluster region protein – Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) (Sawyers, 1999). Ši kinazė nuolat fosforilina įvairių viduląstelių baltymų tirozinius ir taip aktyvina įvairius signalinius kelius, kas sukelia ląstelės supiktybėjimą (intensyvesnę proliferaciją, didesnę atsparumą apoptozei ir pan.) (Deininger et al., 2000). Specifiniai tirozino kinazės slopikliai, tokie kaip imatinibas, nilotinibas ir dasatinibas, ženkliai

sumažino LML pacientų mirtingumą ir šiuo metu LML yra gana sėkmingai kontroliuojama lėtinė liga. Vis dėlto dalis pacientų yra atsparūs arba jiems išsivysto atsparumas tirozino kinazių slopikliams (Baccarani et al., 2013; Loscocco et al., 2019).



1 pav. Supaprastinta hematopoezės schema. Leukeminės ląstelės gali susiformuoti įvykus mutacijoms ląstelėse skirtingose hematopoetinės hierarchijos stadijose (pagal MacLean et al., 2017; Riether et al., 2015).

Ūminė mieloidinė leukemija (ŪML) neturi vienos charakteringos genetinės aberacijos. Šios ligos pacientams būdingi įvairūs kariotipo pakitimai bei genetinės mutacijos. Pagal nustatytų genetinių pakitimų pobūdį prognozuojamas ligos sudėtingumas (Arber et al., 2016). Standartiškai ŪML pacientai gydomi vadinamąja 7 + 3 chemoterapija. Tai yra chemoterapijos kursas, kurio metu 7 dienas pacientui skiriamas citarabinas, po to 3 dienas –

antraciklinas (daunorubicinas, idarubicinas ar pan.) (Juliussen ir Hough, 2016). Citarabinas (taip pat žinomas, kaip citozino arabinozidas, ara-C) yra citozino analogas (jis įjungiamas į DNR ir stabdoma DNR sintezė), o antraciklinai interkaluoja į DNR ir slopina DNR topoizomerazės II veikimą (sukeliamos DNR pažaidos, stabdoma DNR sintezė) (Blair, 2018). Didelė dalis pacientų po šio gydymo pasiekia pilną remisiją, tačiau nemažai jų vėliau atkrenta. Taip pat nemaža dalis pacientų šiam gydymui yra atsparūs (Zebisch et al., 2016). Išgydoma tik mažiau nei pusė suaugusių ŪML pacientų, kurie yra jaunesni nei 60 metų amžiaus, ir tik apytiksliai 10 % vyresnių pacientų (Dohner et al., 2015).

Taigi, tiek gydant mieloidinės leukemijos atvejus su charakteringomis chromosominėmis aberacijomis, tokius kaip ŪPL ar LML, tiek ŪML, yra susiduriama su iššūkiais, nes pacientai gali būti ar gydymo eigoje tapti atsparūs taikomai standartinei terapijai bei gali atkristi po remisijos, todėl būtina vystyti naujus terapijos būdus. Kadangi genetinės aberacijos yra lydimos epigenetinių pakitimų, manoma, kad epigenetinė terapija, ypač kombinuota su kitais terapijos būdais, gali būti svarbus ir galingas vėžinių susirgimų gydymo būdas (Ahuja et al., 2016). Epigenetiniai pakitimai, tokie kaip pakitęs DNR metilinimas ir histonų modifikacijos, išreguliuoja genų raišką ir gali sąlygoti vėžinio susirgimo atsiradimą bei palaikymą. Dažnai stebimas išreguluotas DNR metiltransferazių (DNMT), histonų deacetilazių (HDAC), kai kurių histonų metiltransferazių (HMT) aktyvumas, kas gali sąlygoti vėžį slopinančių genų raiškos slopinimą. Šių epigenetinių moduliatorių slopikliai sukeldami chromatiną dekondensaciją galimai galėtų atkurti vėžį slopinančių genų raišką (Kwon ir Shin, 2011). Pavyzdžiui, natūraliai gamtoje randamas polifenolis EGCG (epigalokatechin-3-galatas) pasižymi gebėjimu slopinti DNMT1 ir HDAC aktyvumą (Khan et al., 2015), sintetinis agentas BIX-01294 slopina EHMT2/G9A histonų metiltransferazės aktyvumą (Kubicek et al., 2007). Daugybei procesų ląstelėje, pavyzdžiui, suintensyvėjusiai proliferacijai ar diferenciacijos blokavimui, įtaką daro epigenetiniai pakitimai (Dawson ir Kouzarides, 2012; Jones et al., 2016). Epigenetinių pakitimų svarbą kancerogenezeje taip pat rodo tai, kad gana didelė dalis mutacijų, būdingų leukeminiams susirgimams, yra nustatoma epigenetinių modifikatorių genuose (Kaushansky ir Zhan, 2018).

Epigenetinės terapijos tikslas yra sukelti tokius epigenetinius pokyčius ląstelėje, kurie arba padėtų atsistatyti sutrikusiam diferenciacijos procesui, arba, kaip ir tradicinė chemoterapija, sukeltų ląstelės žūtį. Tačiau siekiant sukelti vėžinių ląstelių žūtį, yra naudojamos didelės vaistų dozės, o tai gali

turėti rimtą šalutinį poveikį organizmui (Lee ir Lee, 2019). Paveikus ląsteles terapiniais agentais, priklausomai nuo sukeltos žalos dydžio, ląstelės patiria apoptozę arba terapijos indukuotą ląstelinį senėjimą. Pastarasis apibrėžiamas kaip negrįžtamas ląstelės ciklo stabdymas (Provinciali et al., 2013). Paprastai ląstelių senėjimą sukelia mažiau toksiškos cheminių agentų dozės (Chang et al., 1999), taigi, manoma, kad jis yra saugesnis ir sukelia mažiau šalutinių poveikių nei apoptozės indukcija (Lee ir Lee, 2019). Tačiau kai kurie cheminiai agentai ląstelinio senėjimo indukuoti nesugeba (Schwarze et al., 2005). Nors manoma, kad apoptozės indukavimas yra sėkmingesnis vėžio gydymo būdas, vis dėlto cheminio agento gebėjimas sukelti ląstelių senėjimą yra jo privalumas (Nardella et al., 2011). Dėl to šiame darbe taip pat siekėme įvertinti kai kurių tirtų cheminių agentų gebėjimą sukelti vėžinių ląstelių senėjimą.

Jeigu po remisijos stebimas atkritis, reiškia, kad tam tikra vėžinių ląstelių populiacija buvo atspari taikytam gydymui. Buvo parodyta, kad chemoterapiniam gydymui atsparios ŪML ląstelės pasižymi intensyvesniu oksidaciniu fosforiliniu. Slopinant mitochondrijų oksidacinį fosforilinimą, parodyta, kad ląstelės tapo jautresnės chemoterapijai *in vitro* ir *in vivo* (Farge et al., 2017). Dešimtmečiais pagrindiniu vėžinių ląstelių energijos šaltiniu buvo laikoma glikolizė (Weinberg ir Chandel, 2015). Tačiau kadangi pastarųjų metų tyrimai parodė, kad mitochondrijų oksidacinis fosforilinimas yra svarbus veiksnys kai kurių tipų vėžinių ląstelių, tarp jų ir ŪML, chemoterapiniam atsparumui, mitochondrijų oksidacinis fosforilinimas susilaukė daug susidomėjimo iš mokslininkų kaip potencialus ir vertingas kliniškinis taikynys gydant vėžinius susirgimus (Farge et al., 2017; Skrtic et al., 2011).

Šiame darbe buvo tirtas epigenetinių ir metabolinių modifikatorių poveikis mieloidinės leukemijos ląstelių molekuliniais procesams ir potenciali nauda mieloidinės leukemijos terapijai.

Darbo tikslas: įvertinti žmogaus mieloidinės leukemijos ląstelių atsaką į epigenetinius ir metabolinius reguliatorius.

Uždaviniai:

1. Nustatyti natūralaus plačiu veikimu pasižyminčio agento EGCG gebėjimą sukelti epigenetinius pokyčius, ląstelės ciklo stabdymą, apoptozę ir senėjimą ūminės promielocitinės leukemijos ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelėse.

2. Ištirti histonų metiltransferazės EHMT2/G9A sintetinio slopiklio BIX-01294 sukeltus epigenetinius pokyčius bei poveikį ūminės promielocitinės leukemijos ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių likimui.

3. Ištirti histonų deacetilazių ir histonų metiltransferazių slopiklių (belinostato ir 3-deazaneplanocino A) potencialą pagerinti standartinę ūminės promielocitinės leukemijos terapiją.

4. Įvertinti gydymui atsparių ūminės mieloidinės leukemijos pacientų ląstelių metabolinio aktyvumo, proliferacijos ir proteomo pokyčius po poveikio oksidacinio fosforilinimo slopikliais (metforminu, atovakvonu).

Mokslinis naujumas ir praktinė reikšmė

Šiame darbe nagrinėjome žmogaus mieloidinės leukemijos ląstelėse vykstančius procesus, jas paveikus epigenetiniais ir metaboliniais reguliatoriais. Išsamiai išnagrinėjome plačiu veikimu pasižyminčio polifenolio EGCG sukeltą chromatino remodeliavimą ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių linijose: nustatėme histono modifikacijų H3K9me2 ir H3K9me3, Polycomb slopinančio komplekso 2 (PRC2), HP1 α , DNMT1, HDAC baltymų/genų raiškos sumažėjimą. Pirmieji nustatėme, kad EGCG sukelia histonų modifikacijų H3K14Ac ir H4hiperAc persitvarkymą ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių chromatine: sustiprėjusias sąveikas su ląstelės ciklo stabdymu bei diferenciacija susijusių genų promotoriais (*p27*, *PCAF*, *CEBPA*, *CEBPE*) bei sumažėjusias sąveikas su PRC2 komplekso komponentų promotoriais (*EZH2*, *SUZ12*, *EED*). Šie epigenetiniai pokyčiai rodo, kad EGCG dalyvauja sukeldamas heterochromatino dekondensaciją. Taip pat pirmieji parodėme, kad EGCG sukelia ūminės promielocitinės ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių senėjimą, kas taip pat yra svarbu sėkmingai vėžio terapijai. Visapusiškai išnagrinėję EHMT2/G9A histonų metiltransferazės slopiklio BIX-01294 ūminės promielocitinės, ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių linijose sukeltus procesus, parodėme, kad nors BIX-01294 ir nesukelia ląstelinio senėjimo, bet sąlygoja epigenetinių reguliatorių lygio pokyčius, susijusius su vėžinių procesų slopinimu. Gauti rezultatai praplečia jau turimas žinias apie EGCG ir BIX-01294 veikimą vėžinėse ląstelėse bei gali pasitarnauti tolesniame mieloidinės leukemijos terapijos vystyme, ieškant veiksmingų terapinių agentų kombinacijų.

Taip pat pirmą kartą parodėme ir epigenetinių modifikatorių 3-deazaneplanocino A bei belinostato naudą, naudojant kombinacijoje su standartiškai taikoma ŪPL terapija (retinoinė rūgštis + idarubicinas) *in vitro*

ir *ex vivo*. Nustatėme, kad jų sukelti chromatinio pokyčiai yra svarbūs sukeliant stipresnį ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių atsaką (padeda nuslopinti vėžinių ląstelių proliferaciją, stipriau indukuoti apoptozę bei paspartina granulocitinę diferenciaciją). Šios žinios itin naudingos ieškant veiksmingų terapinių kombinacijų prieš standartiniam gydymui atsparią ūminę promielocitinę leukemiją. Įvertinę gydymui atsparių ūminės mieloidinės leukemijos pacientų leukeminių ląstelių atsaką į oksidacinio fosforilinimo slopiklį metforminą, praplėtėme esamas žinias apie metformino bei jo kombinacijos su citarabinu ir venetoclax sukeltus viduląstelinius pokyčius. Atlikta proteomo analizė parodė, kad metforminas sukėlė metaboliniuose keliuose dalyvaujančių baltymų lygio pokyčius. Nors sukelti pokyčiai nėra pakankami atsparių ŪML pacientų gydymui, tačiau manome, kad jie gali vaidinti svarbų pridėtinį vaidmenį, taikant kombinuotą gydymą, ir metforminas gali pasitarnauti kuriant atsparių ūminės mieloidinės leukemijos pacientų terapines kombinacijas.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Siekiant įvykdyti išsikelto tikslą ir uždavinius, buvo panaudoti įvairūs ląstelės ir molekulinės biologijos metodai, kurie išsamiai aprašyti su disertacija susijusiose publikacijose. Šiame skyriuje trumpai apžvelgiama, kokie pagrindiniai metodai buvo naudoti doktorantūros metu.

Ląstelių kultūros ir poveikiai. Buvo naudotos ŪPL ląstelių linijos NB4 ir HL60, LML ląstelių linija K562, ŪPL pacientų kaulų čiulpų ląstelės, gydymui atsparių ŪML pacientų periferinio kraujo ląstelės. Ląstelių poveikiams vieni arba įvairiomis kombinacijomis buvo naudoti epigenetiniai modifikatoriai EGCG, BIX-01294, 3-deazaneplanocinas A, belinostatas, oksidacinio fosforilinimo slopikliai atovakvonas ir metforminas, apoptozės sukėlėjas venetoclax bei standartinėje mieloidinės leukemijos terapijoje naudojami cheminiai agentai retinoinė rūgštis, idarubicinas ir citarabinas.

Ląstelės biologijos metodai. Ląstelių proliferacija bei gyvybingumas buvo vertinami tripano mėlio testu, granulocitinė diferenciacija – nitro tetrazolo mėlio testu. Apoptozės indukcija įvertinta, pažymėjus ląsteles fluoroforu žymėtu aneksinu V ir nudažius propidžio jodidu bei išanalizavus tėkmės citometrijos metodu. Ląstelės ciklo analizė atlikta pagal standartinį dažymo propidžio jodidu protokolą. Ląstelinis senėjimas buvo vertinamas naudojantis su senėjimu susijusios β -galaktozidazės aktyvumo testu. Mitochondrinio kvėpavimo ir glikolizės aktyvumas nustatytas Agilent Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer aparatu (Agilent Dako, Santa Klara, JAV).

Genų raiškos tyrimo metodai. Santykinė genų raiška įvertinta atvirkštinės transkripcijos-kiekybine polimerazine grandinine reakcija (AT-kPGR), Rotor Gene 6000 aparatu (Corbett Life Science, QIAGEN, Hilden, Vokietija). Genų promotorių metilinimo būseną nustatyta metilinimui specifine PGR (MSP).

Baltymų analizės metodai. Baltymų kiekio ir modifikacijų pokyčių analizė atlikta imunoblotu. Hiperacetilinto histono H4 bei acetilinto histono H3K14 sąveikos su tam tikrais genais įvertintos chromatino imunoišsodinimu ir po to atlikta tiksliniams genams specifine kPGR. Ląstelės proteomo analizei pasitelkta skysčių chromatografijos – masių spektrometrija.

Statistinės analizės metodai. Duomenys pateikti kaip vidurkiai su standartiniu nuokrypiu. Skirtumų patikimumumas vertintas naudojant Studento t-testą ar vienkryptę ANOVA.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame skyriuje aptariami svarbiausi doktorantūros metu gauti rezultatai, kurie yra publikuoti su disertacija susijusiose publikacijose. Pirmoje dalyje aptariamas pavienių epigenetinių moduliatorių EGCG ir BIX-01294 sukeltas poveikis mieloidinės leukemijos ląstelėms (1 ir 2 publikacijos). Antroje dalyje – kombinuotos ŪPL terapijos potencialas, t. y. 3-deazaneplanocino A (histonų deacetilazių slopiklio) ir belinostato (histonų metiltransferazių slopiklio) gebėjimas sustiprinti standartiškai klinikoje taikomų agentų poveikį leukeminėms ląstelėms (3 publikacija). Trečioje dalyje apžvelgiami rezultatai, gauti tiriant oksidacinio fosforilinimo slopiklių metformino ir atovakvono sukeltus molekulinis pokyčius ŪML ląstelėse (4 publikacija). Paskutinėje, ketvirtoje dalyje, visi gauti rezultatai apibendrinami.

1. Epigenetinių reguliatorių EGCG ir BIX-01294 poveikio ŪPL ir LML ląstelėms tyrimai

EGCG (epigalokatechin-3-galatas) yra gausiausias ir biologiškai aktyviausias katechinas (polifenolis), išgaunamas iš kininio arbatmedžio (*Camellia sinensis*). Jo gausu žaliojoje arbatoje. Šis katechinas pasižymi įvairiais aktyvumais: antioksidacinis, antibakterinis, priešūždegiminis ir pan. Taip pat yra parodyta, kad EGCG pasižymi ir priešvėžinėmis savybėmis – jis dalyvauja įvairiuose biologiniuose mechanizmuose, susijusiuose su vėžio vystymusi ir progresavimu, tokiais kaip angiogenezė, matastazių slopinimas, ląstelės ciklo stabdymas ir apoptozė (Granja et al., 2016; Singh et al., 2011). EGCG taip pat veikia ir kaip epigenetinių reguliatorių slopiklis – šis polifenolis pasižymi gebėjimu slopinti DNR metiltransferazes (DNMT) ir histonų deacetilazes (HDAC) (Khan et al., 2015). Parodyta, kad EGCG slopina DNMT ir HDAC veikdamas jų genų raišką arba jungdamasis prie šių fermentų tiesiogiai (Khan et al., 2015; Nandakumar et al., 2011; Rajendran et al., 2011).

Kitas mūsų tirtas cheminis agentas BIX-01294 (1-benzilpiperidin-4-il)-6,7-dimetoksi-2-(4-metil-1,4-diazepan-1-il)kvinazolin-4-aminas yra sintetinis specifinio veikimo epigenetinis moduliatorius. BIX-01294 slopina histonų metiltransferazę EHMT2/G9A (euchromatino histonų lizino N-metiltransferazę 1), kuri katalizuoja histono H3K9 dimetilinimą. Daugelyje vėžinių ląstelių tipų yra nustatytas padidėjęs šios genų raišką slopinančios

histonų modifikacijos (H3K9me2) lygis. Taigi EHMT2/G9A vaidina svarbų vaidmenį genų raiškos slopinime ir dėl to yra laikomas potencialiu taikiniu vėžio terapijoje (Huang et al., 2010; Kubicek et al., 2007). Mes tyrėme EGCG ir BIX-01294 potencialą sukelti epigenetinius pokyčius, apoptozę ir senėjimą ūminės promielocitinės leukemijos (ŪPL) bei lėtinės mieloidinės leukemijos (LML) ląstelėse.

1.1. EGCG ir BIX-01294 slopina mieloidinės leukemijos ląstelių proliferaciją ir stabdo ląstelės ciklą

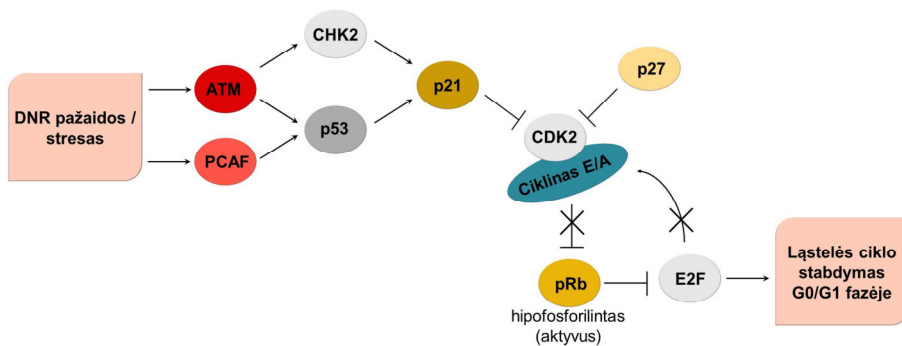
Ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių linijų NB4 ir HL60 bei lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių linijos K562 proliferacija ir gyvybingumas po poveikių epigenetiniais modulatoriais EGCG ir BIX-01294 buvo vertinami tripano mėlio testu tris dienas kas 24 val. Nustatyta, kad abu tirti agentai slopino ŪPL ir LML ląstelių proliferaciją (1 publikacija, 3 lentelė; 2 publikacija, 1A ir 1B pav.). Tačiau siekiant panašaus slopinimo efekto, LML ląsteles reikėjo paveikti didesnėmis EGCG ir BIX-01294 agentų koncentracijomis nei ŪPL ląsteles (1 lentelė). Taip pat nustatyta, kad BIX-01294 tik nežymiai sumažino K562 ląstelių gyvybingumą. Taigi ŪPL ląstelės buvo jautresnės tirtiems epigenetiniams modulatoriams nei LML ląstelės. Kitų autorių taip pat yra parodyta, kad EGCG ir BIX-01294 slopino įvairių tipų vėžinių ląstelių linijų proliferaciją (Ding et al., 2013; Gan et al., 2016). Kadangi daugelyje vėžinių ląstelių tipų yra padidėjusi *G9A* geno raiška, kuri prisideda prie intensyvesnės vėžinių ląstelių proliferacijos (Ding et al., 2013), BIX-01294, slopindamas *G9A*, stabdo vėžinių ląstelių proliferaciją.

1 lentelė. Ląstelių poveikiams naudotos EGCG ir BIX-01294 agentų koncentracijos.

Ląstelių linija	EGCG konc., μM	BIX-01294 konc., μM
NB4	30 ir 40	3 ir 4
K562	120 ir 140	7 ir 8

Nustatę, kad EGCG ir BIX-01294 slopino tirtų mieloidinės leukemijos ląstelių proliferaciją bei mažino gyvybingumą, įvertinome šių agentų poveikį ŪML ir LML ląstelių ciklui. Tuo tikslu po ląstelių poveikio EGCG ir BIX-01294 ištyrėme su ląstelės ciklu susijusių genų raišką AT-kPGR metodu bei įvertinome ląstelių pasiskirstymą skirtingose ląstelės ciklo fazėse standartiniu propidžio jodido testu. Buvo nustatyta, kad paveikus NB4 ir

K562 ląsteles EGCG ir BIX-01294, reikšmingai padidėjo ląstelės ciklo slopiklių *p21*, *Rb* genų raiška ir sumažėjo ląstelės ciklo aktyviklio *CCNA2* geno raiška (bet nesumažėjo *CCNA2* geno raiška po poveikio su EGCG) (2 publikacija, 2A pav.). Parodėme, kad NB4 ir HL60 ląstelėse po poveikio EGCG padidėjo ląstelės ciklo slopiklių *p27* ir *PCAF* genų raiška (1 publikacija, 1C pav.). Tirtų genų dalyvavimas ląstelės ciklo reguliacijoje pavaizduotas 2-ame paveiksle. Ląstelės ciklo analizė propidžio jodido testu patvirtino genų raiškos analizės rezultatus – abu tirti cheminiai agentai sukėlė ŪPL ir LML ląstelių ciklo stabdymą G0/G1 fazėje; EGCG poveikis K562 ląstelėms buvo silpnesnis (2 publikacija, 2D pav.).



2 pav. Ląstelės ciklo stabdymo mechanizmas. DNR pažaidos ar kitas ląstelinis stresas sukelia PCAF ir ATM suaktyvinimą. PCAF acetilina ir taip suaktyvina vėžio slopiklį p53, ATM fosforilina ir taip suaktyvina vėžio slopiklius p53 ir CHK2 kinazę. Pastarieji įjungia p21. p21 ir p27 yra nuo ciklinų priklausomų kinazių (CDK) slopikliai, todėl CDK2-ciklino E/A kompleksai negali fosforilinti (inaktyvuoti) pRb. Hipofosforilintas (aktyvus) pRb jungiasi ir inaktyvuoja transkripcijos veiksnių E2F, kuris nebeaktyvina perėjimui į S fazę būtinų genų raiškos (pvz., ciklino A2, koduojamo *CCNA2*, bei ciklino E2, koduojamo *CCNE2*) (pagal Abbastabar et al., 2018; Aliouat-Denis et al., 2005; Campisi ir d’Adda di Fagagna, 2007; Xenaki et al., 2008).

Anksčiau mūsų mokslinė grupė nustatė, kad BIX-01294 stabdė ląstelės ciklą G0/G1 fazėje ūminės promielocitinės leukemijos NB4 ir HL60 ląstelėse (Savickiene et al., 2014a). BIX-01294 taip pat sukėlė ląstelės ciklo stabdymą G0/G1 fazėje bei padidino p21 baltymo raišką ūminės T limfocitinės leukemijos ląstelėse (Huang et al., 2017). Kitų mokslininkų tyrimuose taip pat parodyta, kad EGCG sukėlė ląstelės ciklo stabdymą G0/G1 fazėje įvairių tipų vėžinėse ląstelėse (Gan et al., 2016). EGCG

slopinio ląstelės ciklo aktyviklių *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1* ir *E2F1* bei padidino ląstelės ciklo slopiklio *p21* raišką tulžies takų vėžinėse ląstelėse (Mayr et al., 2015), sumažino ciklinų D1, CDK4/6 ir fosforilinto Rb baltymo lygį šlapimo pūslės vėžinėse ląstelėse (Chen et al., 2004), sumažino ciklino D1 ir padidino baltymo p21 raišką gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžinėse ląstelėse (Zhang et al., 2012), ir t.t. Taigi šio darbo rezultatai, rodantys, kad EGCG ir BIX-01294 sukėlė ūminės ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių proliferacijos slopinimą bei ląstelės ciklo stabdymą G0/G1 fazėje, koreliuoja su ankstesnių tyrimų rezultatais.

p53 baltymas yra itin svarbus ląstelės ciklo reguliatorius (Chen, 2016), tačiau visose mūsų tirtose ląstelių linijose jis nėra funkcionalus. K562 linijos ląstelės turi *p53* inaktyvuojančią rėmelio poslinkio mutaciją, dėl kurios susiformuoja sutrumpėjęs geno produktas (Law et al., 1993), NB4 ląstelėse p53 yra mutuoatas, todėl nesugeba prisijungti prie DNR (Song et al., 1999), HL60 ląstelėse yra įvykusios didelės *p53* geno delecijos, todėl p53 baltymo raiška šiose ląstelėse nevyksta (Wolf ir Rotter, 1985). Tai rodo, kad mūsų tirtose ląstelėse ciklo slopinimas galimai reguliuojamas per nuo p53 nepriklausomą kelią (2 pav.).

1.2. EGCG ir BIX-01294 gebėjimo sukelti apoptozę, ląstelinių senėjimą ir diferenciaciją analizė

Ląstelės ciklas sustabdomas įvykus DNR pažaidoms arba indukavus ląstelių diferenciaciją (Campisi ir d'Adda di Fagagna, 2007; Ullmannová et al., 2003). Priklausomai nuo pažaidų lygio ir pobūdžio, ląstelės gali pataisyti pažaidas ir grįžti į ciklą, tačiau jeigu pažaidų lygis yra didesnis, įvyksta apoptozė arba ilgalaikis ląstelės ciklo sustabdymas G0/G1 ciklo fazėje – ląstelinis senėjimas (Campisi ir d'Adda di Fagagna, 2007). Diferenciacijos indukcija taip pat pasireiškia ląstelės ciklo stabdymu G0/G1 fazėje (Ullmannová et al., 2003).

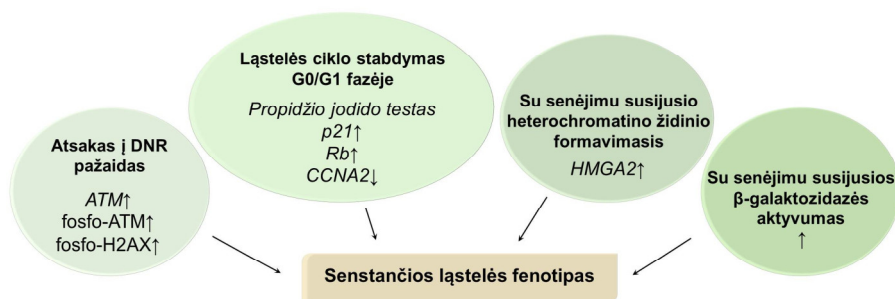
Kitų autorių parodyta, kad BIX-01294 sukelia apoptozę neuroblastomos ląstelėse, EGCG – krūties, kiaušidžių, skrandžio, plaučių, prostatos ir kitų vėžio tipų ląstelių linijose (Gan et al., 2016; Lu et al., 2013). Mes apoptozės indukciją įvertinome pagal tai, ar ląstelės ant membranos paviršiaus eksponuoja fosfatidilseriną (žymėdami aneksinu V) bei pagal ląstelės membranos pralaidumą propidžio jodidui. Parodėme, kad abu tirti agentai, EGCG ir BIX-01294, sukėlė apoptozę ŪPL ląstelėse (1 publikacija, 1A pav.; 2 publikacija, 1C pav.). Kaip minėta, lėtinės mieloidinės leukemijos K562

ląstelių poveikiams buvo naudotos didesnės agentų koncentracijos, bet šios ląstelės išliko atsparios apoptozei (2 publikacija, 1C pav.). Kitų autorių parodyta, kad, K562 ląsteles paveikus interferonu ir imatinibu, jos buvo atsparios apoptozei, bet panaudojus jų kombinaciją su BIX-01294, buvo ženkliai nuslopinta K562 ląstelių proliferacija ir sukelta apoptozė (Loh et al., 2014). Taigi nors EGCG ir BIX-01294 nesukėlė apoptozės K562 ląstelėse, šie agentai galėtų būti naudingi įvairiose kombinacijose su kitais agentais.

Kadangi cheminių agentų gebėjimas sukelti vėžinių ląstelių senėjimą laikomas vienu iš potencialių vėžio terapijos būdų (Nardella et al., 2011), įvertinome, ar epigenetiniai modulatoriai EGCG ir BIX-01294 indukavo ląstelių senėjimą ŪPL ir LML ląstelėse. Ląstelės ciklo stabdymas G0/G1 fazėje yra pagrindinis, tačiau nepakankamas požymis, siekiant nustatyti, ar vyksta ląstelių senėjimas (Campisi ir d'Adda di Fagagna, 2007). Todėl mes tyrėme EGCG ir BIX-01294 įtaką DNR pažeidimų atsako (angl. *DNA damage response*) baltymams ATM ir H2AX, kurie gali sukelti ląstelinį senėjimą. Taip pat analizavome *HMGA* geno, kuris yra reikalingas su senėjimu susijusių heterochromatino židinių (angl. *senescence-associated heterochromatin foci*) formavimuisi, raiškos pokyčius. Įvertinome ir su senėjimu susijusios β -galaktozidazės aktyvumą. Visi kartu šie elementai apibrėžia įvairių ląstelių tipų senėjimo fenotipą (Campisi ir d'Adda di Fagagna, 2007).

Yra parodyta, kad EGCG slopina telomerazės aktyvumą. Telomerazės slopinimas gali sukelti replikacinį senėjimą dėl telomerų trumpėjimo, kas ir buvo parodyta po prailginto ląstelių auginimo veikiant jas mažesnėmis (15 μ M) EGCG dozėmis (Naasani et al., 1998). Remdamiesi mūsų tyrimų rezultatais galime teigti, kad mieloidinės leukemijos ląsteles (NB4 ir K562) paveikus EGCG, ląstelių senėjimas nustatytas jau po 3 dienų: sukeltas ląstelės ciklo stabdymas, padidėjo *ATM* ir *HMGA2* genų raiška ir *ATM* baltymo fosforilinimo lygis, pagausėjo su senėjimu susijusios β -galaktozidazės aktyvumu pasižyminčių ląstelių skaičius (2 publikacija, 2 ir 3 pav.) (3 pav.). Tuo tarpu BIX-01294 mūsų tirtų ląstelių senėjimo neindukavo: nors paveikus šiuo agentu ir buvo sukeltas ląstelės ciklo stabdymas bei padidėjo *HMGA2* geno raiška, tačiau nei *ATM* geno raiškos, nei *ATM* baltymo fosforilinimo lygio padidėjimas nebuvo ryškus, taip pat nenustatytas su senėjimu susijusios β -galaktozidazės aktyvumu pasižyminčių ląstelių skaičiaus padidėjimas (2 publikacija, 2 ir 3 pav.). Senstančios ląstelės pasižymi charakteringu sekreciniu fenotipu, kuris gali skatinti vėžio

vystymąsi, todėl besikaupiančios senstančios ląstelės ilgai gali tapti žalingos organizmui (Maria ir Ingrid, 2017).



3 pav. EGCG sukelia ląstelių senėjimo procesus ūminės promielocitinės leukemijos NB4 ir lėtinės mieloidinės leukemijos K562 ląstelėse (pagal 2-ą publikaciją).

Kaip minėta aukščiau, ląstelės ciklas taip pat stabdomas, kai vyksta ląstelių diferenciacija. Paveikę ŪPL ląsteles EGCG ir įvertinę granulocitinę diferenciaciją nitro tetrazolo mėlio testu, diferenciacijos nenustatėme. Tačiau įvertinę su diferenciacija susijusių genų *CEBPA* ir *CEBPE* raišką, nustatėme, kad jų raiška padidėjo (1 publikacija, 1C pav.). Anksčiau mūsų mokslinės grupės atlikti tyrimai parodė, kad BIX-01294 taip pat nesukelia ŪPL ląstelių granulocitinės diferenciacijos (Savickiene et al., 2014a). Vėlgi su hematopoeze susijusių genų *SPI1* ir *CBFB* raiška po poveikių EGCG ir BIX-01294 padidėjo tiek NB4, tiek K562 ląstelėse (2 publikacija, 3A pav.). Be to, ankstesnėse studijose buvo parodyta, kad tiek EGCG, tiek BIX-01294 sustiprina ŪPL diferenciaciją, kai naudojami kombinacijoje su retinoine rūgštimi (Britschgi et al., 2010; Savickiene et al., 2014a). Taigi mūsų tyrimų rezultatai patvirtina tai, kad abu tirti epigenetiniai modulatoriai gali sustiprinti mieloidinių ląstelių diferenciaciją, kai naudojami kombinuotai su diferenciacijos induktoriais. Apibendrinant, EGCG ir BIX-01294 nesukėlė granulocitinės ŪPL ląstelių diferenciacijos, indukavo jų apoptozę; paveikus EGCG buvo sukeltas ŪPL ir LML ląstelių senėjimas.

1.3. EGCG ir BIX-01294 sukelia mieloidinės leukemijos ląstelių epigenetinius pokyčius

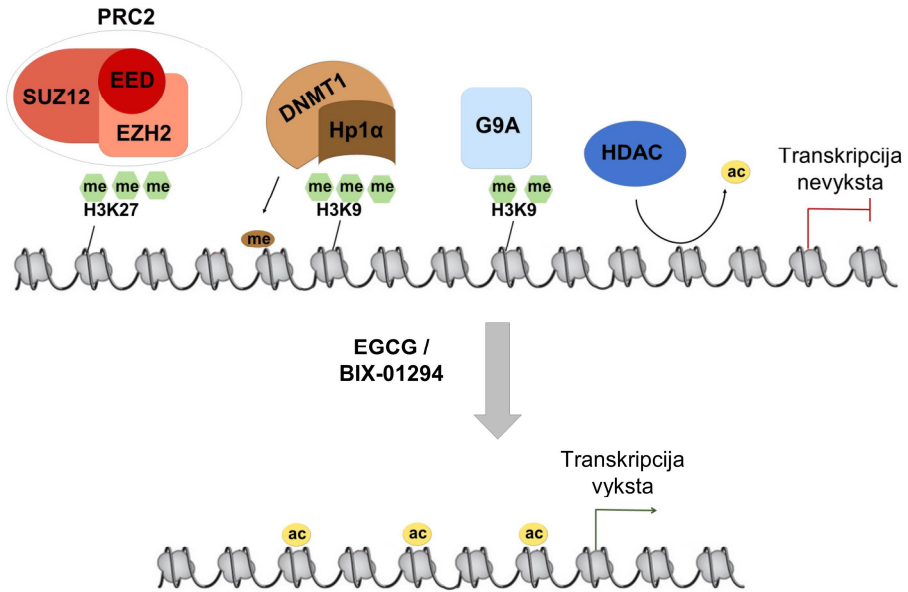
Žinoma, kad epigenetiniai pakitimai yra svarbus vėžinių ląstelių bruožas, todėl analizavome, kokius epigenetinius pokyčius mieloidinės leukemijos ląstelėms sukelia epigenetiniai modulatoriai EGCG ir BIX-01294. Šiame

darbe Western blot metodu analizavome H3K9me3, HP1 α , DNMT1 ir Polycomb slopinančio komplekso 2 (angl. *Polycomb repressive complex 2*) (PRC2) baltymų EZH2, SUZ12, EED kiekio pokyčius mieloidinės leukemijos ląstelėse po poveikių EGCG ir BIX-01294. Histonu H3K9me3 modifikacija tarnauja kaip baltymo HP1 α prisijungimo platforma. Pastarasis pritraukia DNMT1 ir taip susiformuoja genų raišką slopinantis heterochromatino kompleksas. Todėl padidėję H3K9me3, HP1 α ir DNMT1 kiekiai siejami su vėžiškumą slopinančių genų raiškos nutildymu (Estève et al., 2006). PRC2 komplekso baltymų (EZH2, SUZ12, EED) raiška taip pat siejama su heterochromatino formavimusi; padidėjęs jų lygis yra nustatytas įvairiose vėžinėse ląstelėse (Sparmann ir van Lohuizen, 2006). Ūminės promielocitinės leukemijos NB4 ląstelėse po poveikių EGCG ir BIX-01294 visų šių chromatiną slopinančių baltymų kiekiai sumažėjo. Tačiau K562 ląstelės buvo atsparios EGCG – po šio poveikio sumažėjo tik DNMT1 baltymo kiekis. Taip pat ir BIX-01294 poveikis K562 ląstelėms buvo šiek tiek silpnesnis lyginant su poveikiu NB4 ląstelėms (2 publikacija, 4 pav.).

Įvertinę PRC2 komplekso baltymus koduojančių genų (*EZH2*, *SUZ12*, *EED*) raiškos pokyčius ūminės promielocitinės leukemijos NB4 ir HL60 ląstelėse po poveikio EGCG, nustatėme, kad šių genų raiška taip pat sumažėjo (1 publikacija, 3B pav.). Kitų autorių yra parodyta, kad EGCG nuslopino PRC2 komponento EZH2 raišką bazaliosios ląstelėse (Balasubramanian et al., 2010). Taip pat parodyta, kad EGCG veikia kaip DNMT ir HDAC slopiklis, t. y. jungiasi prie DNMT3B ir HDAC1 ir taip sumažina pastarųjų fermentinį aktyvumą gimdos kaklelio vėžinėse ląstelėse (Khan et al., 2015). Mes parodėme, kad sumažėjo *DNMT1* bei histonų deacetilazių *HDAC1* ir *HDAC2* genų raiška NB4 ir HL60 ląstelėse (1 publikacija, 3A pav.). Kitų mokslininkų taip pat yra parodyta, kad EGCG nuslopino epigenetinių modifikatorių *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* genų raišką ir taip sumažino bendrą DNR metilinimo lygį epidermoidinės karcinomos ląstelėse (Nandakumar et al., 2011). Taip pat nustatyta, kad EGCG sumažino *HDAC1*, *HDAC2* ir *HDAC3* genų raišką prostatos vėžinėse ląstelėse (Rajendran et al., 2011). Apibendrinant, nustatėme, kad EGCG nuslopina *DNMT1* ir *HDAC1/2* genų raišką ūminės promielocitinės leukemijos NB4 ir HL60 ląstelėse.

Kitas epigenetinis modulatorius – histonų metiltransferazė EHMT2/G9A – katalizuoja histono H3K9 dimetilinimą (H3K9me2), kuris yra heterochromatino žymuo. Padidėjusi EHMT2/G9A raiška būdinga daugeliui vėžinių susirgimų (J. Zhang et al., 2015). BIX-01294 yra žinomas, kaip

specifinis šios histonų metiltransferazės slopiklis. Anksčiau mūsų mokslinės grupės atlikti tyrimai parodė, kad histono modifikacijos H3K9me2 kiekis ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėse sėkmingai sumažėjo po poveikio agentu BIX-01294 (Savickiene et al., 2014a). Šiame tyrime nustatėme, kad paveikus ŪPL ląsteles EGCG, taip pat sumažėjo *G9A* geno raiška bei histono modifikacijos H3K9me2 kiekis (1 publikacija, 3A ir 4A pav.).



4 pav. EGCG ir BIX-01294 poveikis ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių chromatinui: nustatytas histono modifikacijų H3K9me2 ir H3K9me3, PRC2 komplekso, HP1 α , DNMT1, HDAC genų/baltymų raiškos sumažėjimas, taip sukeliama heterochromatino decondensacija ir vėžį slopinančių genų transkripcijos aktyvacija (pagal 1-ą ir 2-ą publikacijas bei Savickiene et al., 2014a).

Nors parodėme, kad paveikus ŪPL ląsteles EGCG, sumažėjo *HDAC1* ir *HDAC2* raiška, Western blot metodu įvertinę histonų modifikacijų H4hiperAc ir H3K14Ac kiekius, ryškių histonų acetilinimo pokyčių nenustatėme (1 publikacija 4A pav.). Atlikę chromatinio imunoišsodinimą, naudodami antikūnus prieš H4hiperAc ir H3K14Ac, įvertinome šių histonų sąveiką su PRC2 komplekso genų (*EZH2*, *SUZ12* ir *EED*) bei su diferenciacija ir ląstelės ciklo reguliacija susijusių genų (*p27*, *PCAF*, *CEBPA* ir *CEBPE*) promotoriais po poveikio EGCG NB4 ląstelėse. Didesnis genų promotorinių sričių acetilinimas siejamas su aktyvesne genų raiška.

Buvo parodyta, kad po poveikio EGCG sumažėjo hiperacetilinto H4 ir acetilinto H3K14 sąveikų su PRC2 komplekso komponentus koduojančių genų *EZH2*, *SUZ12* ir *EED* promotorinėmis sritimis. Tačiau pagausėjo šių histonų modifikacijų sąveikų su *p27*, *PCAF*, *CEBPA* ir *CEBPE* promotorinėmis sritimis (1 publikacija, 4B pav.). Taigi chromatinio imunoišsodinimo rezultatai koreliuoja su aukščiau aprašytais genų raiškos pokyčiais. Apibendrinant, EGCG kaip epigenetinis agentas galėtų būti naudingas ūminės promielocitinės leukemijos terapijoje. Tuo tarpu BIX-01294 su vėžio slopinimu susijęs epigenetinis poveikis parodytas ir ūminės promielocitinės, ir lėtinės mieloidinės leukemijų ląstelių linijose. EGCG ir BIX-01294 sukeltų epigenetinių pokyčių schema pateikta 4-ame paveiksle, taip pat šių agentų sukelti epigenetiniai pokyčiai apibendrinti 2-oje lentelėje.

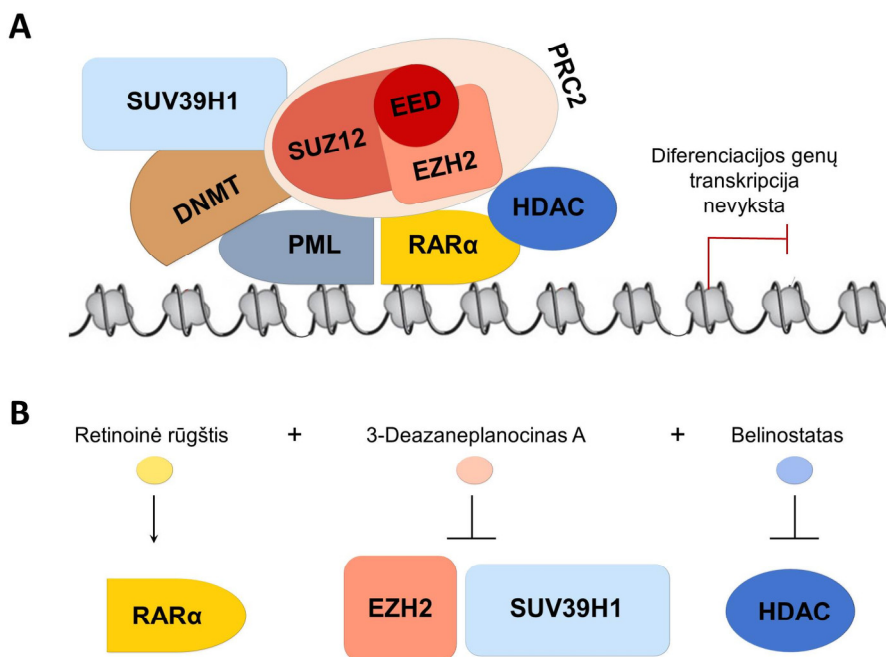
2 lentelė. EGCG ir BIX-01294 sukelti epigenetinių reguliatorių bei histonų modifikacijų lygio pokyčiai. ŪPL – ūminė promielocitinė leukemija; LML – lėtinė mieloidinė leukemija; *pasviris tekstas* – geno pavadinimas; *nepasviris tekstas* – baltymo pavadinimas; ↓ arba ↑ – raiškos ar sąveikos sumažėjimas arba padidėjimas po poveikio (pagal 1-ą ir 2-ą publikacijas).

	EGCG	BIX-01294
ŪPL (NB4 / HL60 ląstelių linijos)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>EZH2</i>↓, <i>EZH2</i>↓, <i>SUZ12</i>↓, <i>SUZ12</i>↓, <i>EED</i>↓. ▪ <i>DNMT1</i>↓, <i>DNMT1</i>↓, <i>Hp1α</i>↓, <i>H3K9me3</i>↓. ▪ <i>G9A</i>↓, <i>H3K9me2</i>↓. ▪ <i>HDAC1</i>↓, <i>HDAC2</i>↓. ▪ H4hiperAc, H3K14Ac: sąveika su <i>EZH2</i>, <i>SUZ12</i>, <i>EED</i> ↓, sąveika su <i>p27</i>, <i>PCAF</i>, <i>CEBPA</i>, <i>CEBPE</i> ↑. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>EZH2</i>↓, <i>SUZ12</i>↓. ▪ <i>DNMT1</i>↓, <i>Hp1α</i>↓, <i>H3K9me3</i>↓.
LML (K562 ląstelių linija)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>DNMT1</i>↓, <i>Hp1α</i>↑. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>EZH2</i>↓, <i>SUZ12</i>↓. ▪ <i>DNMT1</i>↓, <i>Hp1α</i>↓.

2. Kombinuotos epigenetinės terapijos su HDAC ir HMT slopikliais poveikio ŪPL ląstelėms įvertinimas

Kaip minėta, ūminei promielocitinei leukemijai būdingas dėl chromosominės translokacijos susidaręs sulietas PML-RAR α baltymas (Kakizuka et al., 1991). Šis baltymas jungiasi prie DNR, multimerizuojasi per PML domeną ir pritraukia kitus partnerius taip suformuodamas didelį slopinantį baltymų kompleksą. Tarp pritrauktų baltymų yra ir įvairių

chromatino reguliatorių – histonų deacetilazių (HDAC), histonų metiltransferazių (HMT), DNR metiltransferazių (DNMT), Polycomb slopinančių kompleksų 1 ir 2 (PRC1, PRC2) ir t.t. (Arteaga et al., 2015) (5 pav. A). Todėl kombinuota terapija, nukreipta ne tik prieš PML-RAR α , bet ir prieš kitus slopinančio komplekso narius, pavyzdžiui, HDAC ir HMT, galėtų pagerinti standartinės ŪPL terapijos efektyvumą (5 pav. B).



5 pav. Epigenetinės terapijos veikimo schema. A) Ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėse sulietas PML-RAR α baltymas jungiasi prie DNR ties RARE promotoriumi ir pritraukia įvairius transkripciją slopinančius epigenetinius reguliatorius: Polycomb slopinančius kompleksus (PRC), histonų deacetilazes (HDAC), histonų metiltransferazes (pavyzdžiui, SUV39H1), DNR metiltransferazes (DNMT). Taip susiformuoja didelis baltymų kompleksas, kuris slopina su diferenciacija susijusių genų raišką (pagal Arteaga et al., 2015). B) Standartinį ŪPL gydymo protokolą (retinoinė rūgštis + idarubicinas) papildžius HMT slopikliu 3-deazaneplanocinu A bei histonų deacetilazių slopikliu belinostatu, efektyviai slopinami PML-RAR α suformuoto komplekso baltymai ir taip pagerinamas standartinės ŪPL terapijos efektyvumas.

Kaip žinia, PML-RAR α baltymą efektyviai veikia ir standartiškai gydymui yra naudojama retinoinė rūgštis. Kaip HDAC slopiklį pasirinkome

belinostatą, kuris Maisto ir vaistų administracijos (angl. *Food and Drug Administration, FDA*) 2014 metais yra patvirtintas pasikartojusios ar atsparios T ląstelių limfomos gydymui (O'Connor et al., 2015). Kitas tirtas agentas 3-Deazaneplanocinas A yra nuo S-adenozil-L-metionino priklausomų histonų metiltransferazių, tarp jų ir EZH2, slopiklis. Ikiklinikinių tyrimų metu yra parodyta, kad jis geba slopinti ląstelių proliferaciją bei sukelti apoptozę įvairių tipų vėžinėse ląstelėse (Gaudichon et al., 2014; Shen et al., 2015). Šiame darbe įvertinome, 3-deazaneplanocino A ir belinostato kombinacijos su standartiškai gydymui naudojamais agentais (retinoine rūgštimi ir idarubicinu) poveikį *in vitro* (ląstelių linijoms NB4 ir HL60) bei *ex vivo* (ŪPL paciento promielocitams, turintiems *PML-RARA* translokaciją).

2.1. Kombinuoto agentų poveikio ŪPL ląstelėms analizė

Anksčiau mūsų tyrimų grupė parodė, kad epigenetiniai slopikliai 3-deazaneplanocinas A ir belinostatas kombinacijoje su retinoine rūgštimi (be idarubicino) slopino ŪPL ląstelių proliferaciją, sukėlė apoptozę, pagerino granulocitinę diferenciaciją ir sukėlė chromatinio persitvarkymą *in vitro* (Valiuliene et al., 2017). Be to, tiriant ksenografinių pelių modelius, buvo parodyta, kad tokia kombinuota terapija prailgino ŪPL ksenografinių pelių išgyvenimo trukmę ir apsaugojo nuo auglio susiformavimo (Valiuliene et al., 2016). Šiame tyrime iš ŪPL paciento, turinčio *PML-RARA* translokaciją, kaulų čiulpų ląstelių buvo išskirtos baltosios vienbranduolės ląstelės (apie 70 % jų sudarė nesubrendę promielocitai). NB4 ir HL60 ląstelių linijos bei ŪPL paciento leukeminės ląstelės buvo veiktos 1 μ M retinoinės rūgšties, 2 nM arba 8 nM idarubicino, 0,5 μ M 3-deazaneplanocino A ir 0,2 μ M belinostato skirtingomis kombinacijomis 72 val. Įvertinome šių kombinacijų poveikį ŪPL paciento leukeminėms ląstelėms ir ŪPL ląstelių linijoms, t. y. jų proliferacijai, ląstelės ciklui, apoptozei, granulocitinei diferenciacijai ir metaboliniam aktyvumui.

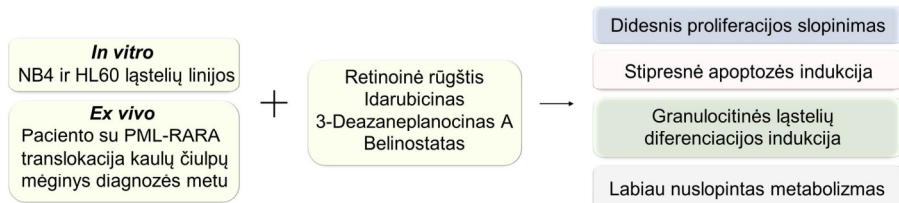
Tripano mėlio testu nustatėme, kad 3-deazaneplanocinas A ir belinostatas sustiprino standartiškai gydymui naudojamų agentų (retinoinės rūgšties ir idarubicino) poveikį tiek tirtų ląstelių linijų, tiek paciento ląstelių proliferacijos ir gyvybingumo slopinimui (3 publikacija, 1A pav.). Idarubicinas slopina DNR topoizomerazę II, todėl sutrikdo DNR sintezę ir sustabdo ląstelės ciklą G2 fazėje (Hollingshead ir Faulds, 1991). Tuo tarpu, retinoinė rūgštis, belinostatas ir 3-deazaneplanocinas A sukelia ląstelių

kaupimąsi G0/G1 fazėje (Pan et al., 2016; Savickiene et al., 2014b). Įvertinę standartiniu propidžio jodido testu, parodėme, kad retinoinės rūgšties, belinostato ir 3-deazaneplanocino A kombinacija su mažesne idarubicino doze (2 nM) sukėlė NB4 ir HL60 ląstelių ciklo stabdymą G0/G1 fazėje, tačiau naudojant didesnę idarubicino dozę HL60 ląstelėse jau po 24 val. stebimas ciklo stabdymas G2 fazėje (3 publikacija, 2A pav.). Ląstelės ciklo slopiklių *ATM*, *p21*, *p27* ir *Rb* bei ląstelės ciklo aktyviklio *CCNE2* genų raiškos analizė AT-kPGR metodu patvirtino šiuos atradimus (3 publikacija, 2B pav.). Tirtų genų dalyvavimas ląstelės ciklo reguliacijoje pavaizduotas 2-ame paveiksle.

Remdamiesi Western blot metodu nustatytais su apoptoze susijusių baltymų BCL-2 ir BAX raiškos pokyčiais ir kaspazės-3 aktyvacija bei aneksino V / propidžio jodido dažymo metodu, galime teigti, kad nauja mūsų siūloma kombinacija (retinoinė rūgštis + idarubicinas + belinostatas + 3-deazaneplanocinas A) suintensyvino apoptozės procesą (3 publikacija, 1B, 1C ir 4 pav.). Daugelio mokslininkų yra parodyta, kad 3-deazaneplanocinas A slopina įvairių tipų vėžinių ląstelių proliferaciją bei sukelia apoptozę. Pavyzdžiui, vienoje iš studijų parodyta, kad šis HMT slopiklis slopino storosios žarnos vėžio ląstelių augimą ir apoptozę, sukėlė senėjimą ir pakeitė su ląstelės ciklu susijusių baltymų lygį (Sha et al., 2015). Kito tyrimo metu 3-deazaneplanocinas A slopino periferinių nervų dangalo vėžinių ląstelių proliferaciją ir išgyvenamumą pelės ksenograftiniuose modeliuose *in vivo* (P. Zhang et al., 2015). Belinostatas taip pat slopino ląstelių proliferaciją ir sukėlė apoptozę įvairių tipų žmogaus vėžinėse ląstelėse, tarp jų ir ŪPL ląstelių linijose NB4 ir HL60, kaip parodyta ankstesniais mūsų grupės tyrimais (Savickiene et al., 2014b).

Nitro tetrazolo mėlio testu parodėme, kad naujai siūloma kombinacija (retinoinė rūgštis + idarubicinas + belinostatas + 3-deazaneplanocinas A), lyginant su standartiškai terapijoje naudojamais agentais (retinoinė rūgštis + idarubicinas), paspartino ŪPL paciento ląstelių granulocitinę diferenciaciją, NB4 ir HL60 ląstelių diferenciacijos intensyvumas buvo panašus po visų tirtų kombinacijų su retinoine rūgštimi. Tai patvirtino ir AT-kPGR metodu nustatyta padidėjusi su diferenciacija susijusių genų CEBPE ir PPARG raiška (3 publikacija, 3 pav.). Taip pat, paveikus NB4 ląsteles retinoinės rūgšties, idarubicino, 3-deazaneplanocino A ir belinostato kombinacija, nustatytas oksidacinio fosforilinimo ir glikolizės intensyvumo slopinimas (3 publikacija, 1D pav.). Taigi praturtinus standartiškai ŪPL gydymui naudojamą retinoinės rūgšties ir idarubicino kombinaciją epigenetiniais

slopikliais 3-deazaneplanocinu A ir belinostatu, nustatyta, kad tiek *in vitro* (ląstelių linijose NB4 ir HL60), tiek *ex vivo* (ŪPL paciento ląstelėse) buvo sustiprintas priešvėžinis kombinacijos poveikis – labiau nuslopinta proliferacija, stabdytas ląstelės ciklas, suintensyvinta apoptozė, indukuota granulocitinė diferenciacija bei nuslopintas metabolinis aktyvumas (6 pav.).



6 pav. Standartinės ŪPL terapijos agentų (retinoinės rūgšties ir idarubicino) kombinacija su epigenetiniais agentais (belinostatu ir 3-deazaneplanocinu A) sustiprina standartinės terapijos poveikį ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėms (pagal 3-čią publikaciją).

2.2. Kombinuotas agentų poveikis sukelia epigenetinius pokyčius leukeminėse ląstelėse

HDAC slopikliai yra plačiai tiriami įvairių sutrikimų gydymui, tokių kaip vėžys, neurodegeneraciniai sutrikimai, imuninės sistemos sutrikimai ir t.t. (Hull et al., 2016). Kai kurie HDAC slopikliai jau yra patvirtinti kaip vaistai (vorinostatas, belinostatas, panobinostatas, romidepsinas ir kt.) (Eckschlager et al., 2017). Tyrimais pademonstruota, kad žemas acetilimo lygis koreliuoja su blogesne vėžinių susirgimų prognoze (Glozak ir Seto, 2007). HMT fermentai yra mažiau ištirti, tačiau žinoma, kad išreguluota jų veikla taip pat yra laikoma vėžio žymeniu. Taigi HMT taip pat yra perspektyvūs vaistų taikiniai, o jų slopikliai yra verti dėmesio, ieškant naujų leukemijos gydymo būdų (Chopra ir Bohlander, 2015). Parodyta, kad tiek HDAC, tiek HMT dalyvauja ląstelės proliferacijos, diferenciacijos ir kt. ląstelės likimą nulemiančiuose procesuose (Eckschlager et al., 2017; Suzuki et al., 2013). Tuo įsitikinome ir mes, kai standartiškai ŪPL leukemijos terapijoje naudojamų agentų (retinoinė rūgštis + idarubicinas) poveikį papildėme HDAC slopikliu belinostatu bei HMT slopikliu 3-deazaneplanocinu A ir paveikėme ŪPL ląstelių linijas (NB4, HL60) ir ŪPL paciento ląsteles: sustiprėjo proliferacijos slopinimas ir apoptozės indukcija, o tirtu ŪPL paciento atveju ir diferenciacija.

Įvairių terapinių agentų kombinavimas dažnai turi sinergistinį arba papildantį poveikį. Todėl epigenetiniai agentai dažnai būna naudojami su kitokiu poveikiu pasižyminčiais agentais (Eckschlager et al., 2017). Buvo parodyta, kad 3-deazaneplanocino A (HMT slopiklio) ir vorinostato (HDAC slopiklio) kombinacija turėjo sinergistinį poveikį nesmulkių ląstelių plaučių karcinomos ląstelėms; tai gali būti paaiškinta tuo, kad HDAC aktyvumas yra reikalingas histonų metiltransferazės EZH2 sukeltam transkripcijos slopinimui (EZH2 sąveikauja su HDAC per kitą PRC2 baltymą EED) (Takashina et al., 2016). Taip pat nustatyta, kad 3-deazaneplanocino A ir panobinostato (HDAC slopiklio) kombinacija efektyvesnė nei pavieniai poveikiai tiriant ūminės mieloidinės leukemijos atsaką pelių modeliuose (Fiskus et al., 2009). Anksčiau mūsų mokslinė grupė parodė, kad 3-deazaneplanocinas A ir belinostatas papildė retinoinės rūgšties poveikį ŪPL *in vitro* ir *in vivo* (Valiulienė et al., 2016, 2017). Kaip jau minėta, šiame tyrime parodėme, kad standartiškai terapijoje naudojamų agentų – retinoinės rūgšties ir idarubicino – kombinaciją papildžius šiais epigenetiniais slopikliais (belinostatu ir 3-deazaneplanocinu A), sukeltas stipresnis poveikis *in vitro* ir *ex vivo*.

Siekdami parodyti, kad tirti epigenetiniai slopikliai sukėlė chromatino persitvarkymą, Western blot metodu įvertinome histonų H3K14 ir H4 acetilinimo bei H3K27 metilinimo pokyčius po poveikių įvairiomis 3-deazaneplanocino A, belinostato, retinoinės rūgšties ir idarubicino kombinacijomis ŪPL paciento ir NB4 bei HL60 ląstelėse. Nors histonų modifikacijos H3K27me3 lygio sumažėjimo nenustatėme, tačiau H3K14 ir H4 histonų acetilinimas ženkliai padidėjo po poveikio su standartiškai ŪPL terapijoje naudojamų agentų ir epigenetinių slopiklių kombinacija (3 publikacija, 4 pav.). Taigi HMT slopiklis 3-deazaneplanocinas A ir HDAC slopiklis belinostatas, sukeldami chromatino persitvarkymą, sustiprino retinoinės rūgšties ir idarubicino poveikį ŪPL ląstelėms.

3. Chemoterapijai atsparių ŪML ląstelių metabolizmo moduliavimo tyrimai

Be epigenetinių moduliatorių, šiame darbe taip pat tyrėme ir metabolizmo moduliatorių poveikį ūminės mieloidinės leukemijos ląstelėms. Kitaip nei jau aptarti ūminės promielocitinės ir lėtinės mieloidinės leukemijų atvejai, ūminė mieloidinė leukemija yra itin heterogeniška liga, neturi vienos

konkrečios mutacijos ar chromosomų aberacijos (Arber et al., 2016). Todėl standartinis jos gydymo būdas yra nespecifinė chemoterapija (Juliusson ir Hough, 2016), kurios veiksmingumas, deja, nepakankamas ir gana nemaža dalis pacientų yra atsparūs pirminiam gydymui arba tampa atsparūs pakartotiniam gydymui (Zebisch et al., 2016). Kadangi buvo parodyta, kad gydymui atsparios ŪML ląstelės pasižymi intensyvesniu oksidaciniu fosforiliniu (Farge et al., 2017), šiame tyrime mes įvertinome oksidacinio fosforilinio slopiklių metformino ir atovakvono poveikį gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelėms *ex vivo*.

Metforminas yra plačiai naudojamas kaip vaistas nuo cukrinio diabeto. Yra parodyta, kad jis turi priešvėžinių savybių, bet nėra toksiškas normaliems audiniams (Weinberg ir Chandel, 2015). Metforminas slopina mitochondrijų elektronų pernašos grandinės I kompleksą (Wheaton et al., 2014). Atovakvonas yra antimaliarinis vaistas, labai gerai organizmo toleruojamas oksidacinio fosforilinio slopiklis. Atovakvonas veikia kaip ubikvino analogas ir taip slopina elektronų pernašos grandinės III komplekso aktyvumą. Tiriant vėžinių ląstelių linijas, parodyta, kad atovakvonas galimai pasižymi priešvėžinėmis savybėmis (Fiorillo et al., 2016).

3.1. Gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelių energetinės būklės analizė bei jos moduliavimas oksidacinio fosforilinio slopikliais

Siekiant įvertinti gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelių energetinę būklę, iš periferinio pacientų bei sveikų donorų kraujo buvo išskirtos baltosios vienbranduolės ląstelės. Jų mitochondrinio kvėpavimo (deguonies suvartojimo) ir glikolizės (ekstraląstelinio rūgštėjimo) intensyvumas nustatytas Agilent Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer aparatu. Įvertinus 12-os gydymui atsparių ŪML pacientų ir 2-ų sveikų donorų ląstelių metabolinį aktyvumą, nustatyta, kad daugumos tirtų pacientų ląstelių energetinė būklė yra panaši kaip ir sveikų donorų, išskyrus 2-ų pacientų ląstelėse nustatytas aukštesnis glikolizės lygis bei kitų 2-ų – intensyvesnis oksidacinis fosforilinis (4 publikacija, 1A pav.). Taigi skirtingų gydymui atsparių ŪML pacientų leukeminės ląstelės pasižymi skirtingu metaboliniu aktyvumu.

Svarbu suprasti, kokią įtaką ląstelių metabolizmo skirtumai turi gydymo efektyvumui, todėl skirtingo energetinio būvio ląsteles (pasižyminčias aukštesniu oksidacinio fosforilinio lygiu / intensyvesne glikolize /

santykiškai žemesniu metaboliniu aktyvumu) paveikėme oksidacinio fosforilinimo slopikliais metforminu ir atovakvonu bei jų kombinacijomis su chemoterapiniu agentu citarabinu (citozino analogas) ir apoptozę indukuojančiu agentu venetoclax (BCL-2 slopiklis). Naudotų agentų koncentracijos pasirinktos pagal literatūros duomenis bei remiantis ankstesniais eksperimentais su leukeminių ląstelių linijomis. Oksidacinio fosforilinimo slopiklių kombinacijos buvo pasirinktos su citarabinu ir venetoclax, nes citarabinas yra plačiai naudojamas ir gana efektyvus gydant ŪML (Chhikara ir Parang, 2010), o BCL-2 slopiklis venetoclax klinikiniuose ŪML gydymo tyrimuose neseniai buvo parodytas kaip itin naudingas kartu su standartinėmis terapijomis (Wei ir Tiong, 2017).

Yra parodyta, kad atovakvonas reikšmingai slopino oksidacinį fosforilinimą įvairių tipų vėžinių ląstelių linijose (Ashton et al., 2016). Daug žadantys rezultatai gauti atovakvoną kombinuojant su radioterapija hipofaringinės karcinomos ir storosios žarnos vėžio gydyme pelių modeliuose *in vivo*, taip pat naudojant kartu su doksorubicinu ir veikiant skydliaukės vėžio ląsteles *in vitro* (Ashton et al., 2016; Lv et al., 2018). Vis dėlto, mūsų tyrimuose atovakvonas didelio poveikio gydymui atsparių pacientų ŪML ląstelių oksidacinio fosforilinimo slopinimui neturėjo. Tuo tarpu metforminas šių ląstelių oksidacinį fosforilinimą sėkmingai nuslopino, o metformino kombinacija su citarabinu ir venetoclax slopinantį poveikį dar sustiprino (4 publikacija, 1B pav.). Įvairios epidemiologinės studijos rodo, kad metforminas gali apsaugoti nuo įvairių vėžinių susirgimų, tokių kaip krūties, plaučių, gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio. Vis dėlto yra parodyta, kad metforminas nėra pakankamas kaip monoterapinis agentas, taigi ieškoma efektyviausių jo kombinacijų su kitais terapiniais agentais (Zhang ir Guo, 2016). Viename iš tokių tyrimų parodyta, kad metforminas sinergistiškai veikė kombinacijoje su chemoterapiniais agentais paklitakseliu, karboplatinu ir doksorubicinu (Iliopoulos et al., 2011). Remdamiesi šiais tyrimais, mes tyrėme ne tik metformino bet ir jo kombinacijos su citarabinu ir venetoclax poveikį ŪML ląstelių molekuliniais pokyčiams.

3.2. Molekuliniai pokyčiai gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelėse paveikus metabolizmo modulatoriais

Gydymui atsparių ŪML pacientų ląsteles paveikus atovakvonu, metforminu ir jų kombinacijomis su citarabinu ir venetoclax, įvertinta ląstelių

prolifracija tripano mēlio testu po 24 ir 72 val. Išanalizavome ląstelės ciklo slopiklių *p53*, *p21*, *Rb* ir ląstelės ciklo aktyviklio *CCNA2* (koduoja cikliną A2) genų raišką AT-kPGR metodu. Poveikiai cheminiais agentais neturėjo didelės įtakos ląstelių proliferacijai, tačiau buvo nustatytas didesnis proliferacijos slopinimas po 24 val. poveikio to paciento ląstelėms, kurių pradinis oksidacinis fosforilinimas buvo didžiausias (4 publikacija, 2 pav.). Su ląstelės ciklu susijusių genų *p53*, *p21*, *Rb*, *CCNA2* raiškos pokyčiai taip pat nebuvo dideli. Didesni genų raiškos pokyčiai nustatyti tų pacientų ląstelėse, kurių pradinis oksidacinis fosforilinimas buvo didesnis. Įžvelgti skirtumai tarp skirtingu oksidacinio fosforilinimo intensyvumu pasižyminčių ląstelių nėra statistiškai patikimi, todėl reikalingos platesnės studijos su daugiau tiriamųjų.

3 lentelė. Su metabolizmu susiję viduląsteliniai keliai, pakitę po gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelių poveikių su metforminu (Met) bei metformino kombinacija su citarabinu ir venetoclax (MCV) (pagal 4-ą publikaciją).

KEGG 2016 keliai	Met			MCV		
	Pacientas			Pacientas		
	1	2	4	1	2	4
Anglies metabolizmas	+	+	+	+	+	+
Glikolizė / Gliukoneogenezė	+	+	+	+	+	+
Aminorūgščių biosintezė		+	+	+	+	+
Apoptozė	+		+	+	+	+
Rap1 signalinis kelias	+			+	+	+
Piruvato metabolizmas	+			+	+	+
Pentozijų fosfatų kelias		+	+	+	+	+
Gliukagono signalinis kelias				+	+	+
Ląstelės ciklas			+		+	+
Riebalų rūgščių metabolizmas						+
Krebso ciklas						+

Ląstelės proteomo analizei pasitelktas skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodas. Po poveikio metforminu bei jo kombinacija su citarabinu ir venetoclax trijų pacientų baltymų lygio pokyčius analizavome Enrichr analizės įrankiu. Parodėme, kad paveikus leukemines ląsteles metforminu visų tirtų gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelėse buvo sukelti metaboliniuose keliuose dalyvaujančių baltymų lygio pokyčiai. Metformino kombinacija su citarabinu ir venetoclax sustiprino šį efektą – statistiškai svarbūs pokyčiai palietė dar daugiau viduląstelinių molekulinį kelių.

Daugiausiai metabolinių kelių buvo moduluota to paciento ląstelėse, kurios pasižymėjo intensyviausiu oksidaciniu fosforiliniu (3 lentelė).

Po poveikio metformino, citarabino ir venetoclax kombinacija išanalizavę, kokių konkrečių baltymų lygis pasikeitė visų trijų pacientų ląstelėse, taip pat nustatėme su metabolizmu, apoptoze, ląstelės ciklu susijusių baltymų lygio pokyčius (4 publikacija, 3 pav.). Pavyzdžiui, po ląstelių poveikių nustatyta sumažėjusi 14-3-3 baltymų YWHAB, YWHAE, YWHAZ raiška. Šie baltymai dalyvauja ląstelių proliferacijos, epitelinės-mezenchiminės tranzicijos ir ląstelių migracijos procesuose (Wu et al., 2015). Jie laikomi galimais taikniais gydant kepenų karcinomos, krūties ir kitų tipų vėžinius susirgimus (Wu et al., 2015; Zhu et al., 2018). Kalmodulino (CALM), katepsino D (CDSD) ir α -tubulino baltymų lygis po poveikio taip pat sumažėjo. Kalmodulinas dalyvauja signaliniuose keliuose, susijusiuose su proliferacija ir diferenciacija. Yra parodyta, kad kalmodulino antagonistai sukelia įvairių tipų vėžinių ląstelių apoptozę (Yuan et al., 2015). Katepsinas D yra apoptozės kelių reguliatorius; mokslininkai kuria katepsino D slopiklius krūties vėžio gydymui (Anantaraju et al., 2016). Taip pat yra sėkmingų priešvėžinių preparatų, kurie suardo mikrovamzdelius ir taip sustabdo ląstelės ciklą bei sukelia apoptozę (Bates ir Eastman, 2017). Taigi ŪML ląsteles paveikus oksidacinio fosforilavimo slopiklio metformino, citarabino ir venetoclax kombinacija nustatyti proteomo pokyčiai gydymui atsparių ŪML pacientų leukeminėse ląstelėse gali būti naudingi mieloidinės leukemijos gydyme.

4. Apibendrinimas

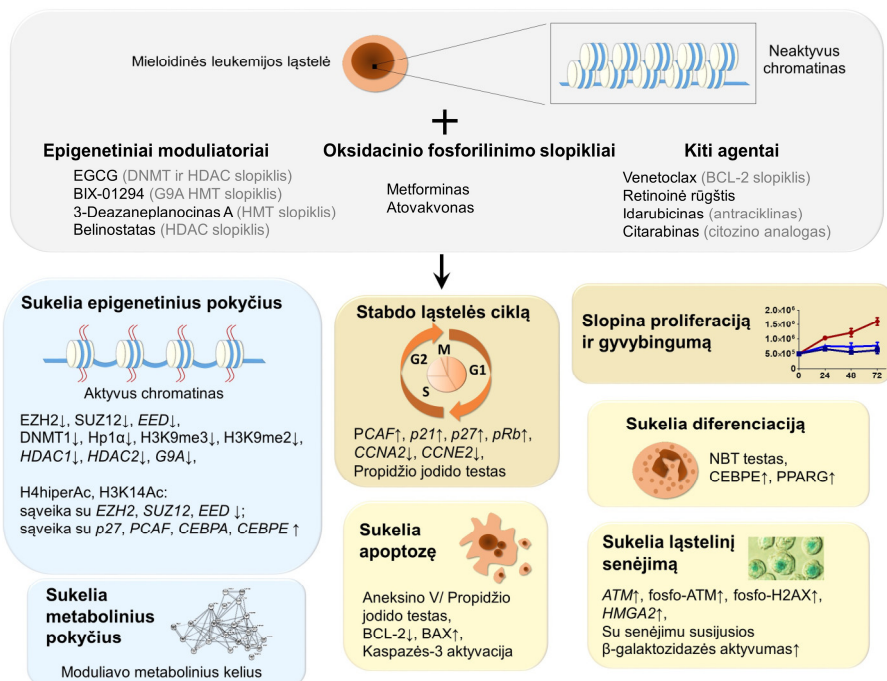
Šiame darbe tyrėme epigenetinių ir metabolinių moduliatorių poveikį mieloidinės leukemijos ląstelių molekuliniam procesams *in vitro* (ląstelių linijų tyrimai) ir *ex vivo* (pacientų leukeminių ląstelių tyrimai). Įvertinome epigenetinių modifikatorių EGCG (natūralaus plačiu veikimu pasižymintio agento) ir BIX-01294 (sintetinio EHMT2/G9A histonų metiltransferazės slopiklio) kaip monoterapinių agentų poveikį ūminės promielocitinės leukemijos ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelėms *in vitro*. Parodėme, kad abu šie agentai sėkmingai slopino mieloidinės leukemijos ląstelių proliferaciją ir stabdė ląstelės ciklą – ŪPL ląstelės buvo jautresnės jų poveikiams nei LML ląstelės. Be to, EGCG ir BIX-01294 sukėlė ŪPL ląstelių apoptozę, tuo tarpu lėtinės mieloidinės leukemijos K562 ląstelės

išliko apoptozei atsparios. Nepaisant to, parodėme, kad EGCG galėtų būti naudingas mieloidinės leukemijos terapijoje kaip ląstelinių senėjimą sukeliantis agentas. Be to, jis sukelia su vėžio slopinimu susijusius histonų modifikacijų bei epigenetinių reguliatorių baltymų lygio pokyčius ŪPL ląstelėse (histono modifikacijų H3K9me2 ir H3K9me3 sumažėjimą, PRC2, HP1 α , DNMT1, HDAC1/2 baltymų/genų raiškos sumažėjimą bei histonų modifikacijų H3K14Ac ir H4hiperAc persitvarkymą chromatine). BIX-01294, nors nesukelia ląstelių senėjimo proceso, bet sukelia epigenetinių reguliatorių PRC2, Hp1 α , DNMT1 baltymų lygio sumažėjimą tiek ŪPL, tiek LML ląstelėse. Taigi EGCG ir BIX-01294 galėtų būti naudingi vystant naujas mieloidinės leukemijos gydymo strategijas.

Taip pat nustatėme, kad papildžius standartinę ŪPL terapiją (retinoinė rūgštis + idarubicinas) epigenetiniais modulatoriais 3-deazaneplanocinu A (HMT slopikliu) bei belinostatu (HDAC slopikliu), sukeltas stipresnis leukeminių ląstelių atsakas *in vitro* ir *ex vivo*. Parodėme, kad buvo sukeltas chromatino persitvarkymas, susijęs su sustiprėjusia transkripcija, kas gali sąlygoti leukemijos gydymui svarbių genų raiškos padidėjimą. Stipresnis ŪPL ląstelių atsakas į epigenetinius agentais praturtintą terapiją pasireiškė labiau nuslopinta ląstelių proliferacija, stipriau indukuota apoptoze, labiau nuslopintu metaboliniu aktyvumu bei paspartinta granulocitine diferenciacija. Taip pat parodėme, kad skirtingi eksperimentiniai modeliai – NB4 ir HL60 ląstelių linijos (*in vitro*) bei ŪPL paciento leukeminės ląstelės (*ex vivo*) – pasižymi panašiu jautrumu epigenetiniais agentais praturtintam poveikiui.

Ištyrę metabolinių moduliatorių metformino ir atovakvono poveikį gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelėms, nustatėme, kad mūsų tyrime metforminas efektyviau slopino ląstelių oksidacinę fosforilinimą nei atovakvonas. Atlikę proteomo analizę, parodėme kad metforminas moduliavo metaboliniuose keliuose dalyvaujančių baltymų lygį. Metformino kombinacija su citarabinu ir venetoclax sustiprino šį poveikį, tačiau turėjo nežymią įtaką gydymui atsparių ŪML pacientų ląstelių proliferacijai. Taigi oksidacinio fosforilinimo slopinimas sukėlė su vėžinių procesų slopinimu susijusius molekulinis pokyčius, tačiau jie nebuvo pakankami chemoterapijai atsparių ŪML pacientų gydymui. Remiantis gautais rezultatais yra tikslinga vykdyti tolesnius tyrimus ieškant naujų efektyvių terapinių agentų kombinacijų. Pavyzdžiui, oksidacinio fosforilinimo slopikliai galėtų sinergistiškai veikti su glikolizės slopikliais. Tačiau glikolizės ir oksidacinio fosforilinimo slopinimo kombinavimas gali būti per

daug toksiškas organizmui (Weinberg ir Chandel, 2015). Taip pat galimai efektyvus poveikis terapijai galėtų būti oksidacinio fosforilinimo slopiklių kombinacijos su epigenetiniais modifikatoriais.



7 pav. Mieloidinės leukemijos ląstelių atsakas į tyrimuose naudotus poveikius.

Apibendrinant, patikrinti cheminiai modulatoriai ir jų kombinacijos yra efektyvios sukeldami priešvėžinius molekulinis pokyčius mieloidinės leukemijos ląstelėse. Tačiau dėl skirtingų pakitimų vėžinėse ląstelėse, kiekvienam pacientui reikalinga individualiai pritaikyta terapija. Gautų tyrimų rezultatus apibendrinanti schema pateikta 7-ame paveiksle.

IŠVADOS

1. Plačiu veikimu pasižymintis žaliojoje arbatoje randamas polifenolis EGCG slopina ūminės promielocitinės leukemijos ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių proliferaciją, stabdo ląstelės ciklą G0/G1 fazėje, sukelia ląstelinį senėjimą; taip pat indukuoja ūminės promielocitinės leukemijos ląstelių apoptozę bei su vėžinių procesų slopinimu susijusius histonų modifikacijų ir epigenetinių reguliatorių lygio pokyčius (histono modifikacijų H3K9me2 ir H3K9me3 sumažėjimą, PRC2, HP1 α , DNMT1, HDAC1/2 baltymų/genų raiškos sumažėjimą bei histonų modifikacijų H3K14Ac ir H4hiperAc persitvarkymą chromatine) *in vitro*.

2. EHMT2/G9A histonų metiltransferazės slopiklis BIX-01294 stabdo proliferaciją bei ląstelės ciklą, sukelia su vėžinių procesų slopinimu susijusį epigenetinių reguliatorių PRC2, Hp1 α , DNMT1 lygio sumažėjimą ūminės promielocitinės leukemijos ir lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelėse bei indukuoja apoptozę ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėse *in vitro*.

3. Histonų metiltransferazių slopiklis 3-deazaneplanocinas A ir histonų deacetilazių slopiklis belinostatas sustiprina standartinės terapijos (retinoinės rūgšties ir idarubicino) poveikį ūminės promielocitinės leukemijos ląstelėms *in vitro* ir *ex vivo*: sukeldami chromatinio persitvarkymą šie epigenetiniai modulatoriai padeda nuslopinti ląstelių proliferaciją, stipriau indukuoti apoptozę bei paspartina granulocitinę diferenciaciją.

4. Oksidacinio fosforilavimo slopiklis metforminas nei vienas, nei kombinacijoje su citozino analogu citarabinu bei apoptozės sukėlėju venetoclax neturi žymaus poveikio gydymui atsparių ūminės mieloidinės leukemijos pacientų ląstelių proliferacijai, tačiau jis sukelia metaboliniuose keliuose, apoptozėje, ląstelės cikle dalyvaujančių baltymų lygio pokyčius *ex vivo*, kurie gali būti naudingi taikant kombinuotą gydymą su kitais terapijos būdais.

SUMMARY

Genetic and epigenetic alterations in hematopoietic cells cause blood cancer – leukemia. Leukemia could be divided into myeloid and lymphoid depending on the hematopoietic lineage it targets. Also, leukemia can be acute (rapidly progressing) and chronic (slowly progressing) (Martinez-Climent et al., 2006). In this study, we concentrated on myeloid leukemia, which is a very heterogeneous disease (Estey, 2016). It occurs mainly in adult patients and its incidence increases with age (Tamamyian et al., 2017).

Acute promyelocytic leukemia is a subgroup of acute myeloid leukemia commonly characterized by chromosomal translocation $t(15;17)(q22;q21)$. This translocation generates the fusion protein PML-RAR α , which blocks promyelocyte differentiation into granulocytes (Kakizuka et al., 1991; Masetti et al., 2012). Chronic myeloid leukemia possess another translocation $t(9;22)(q34;q11)$, which is called Philadelphia chromosome. It results in a constitutively active BCR-ABL tyrosine kinase (Sawyers, 1999). These two types of myeloid leukemia are quite successfully treated nowadays: retinoic acid targets PML-RAR α (Wang et al., 2016), imatinib and other tyrosine kinase inhibitors target BCR-ABL (Baccarani et al., 2013). However, a part of patients develop resistance to the treatment or relapse (Loscocco et al., 2019; Lou et al., 2015; Tomita et al., 2013). Meanwhile, acute myeloid leukemia patients possess various different genetic aberrations, thus chemotherapy (not specific to target) is a standard approach for its treatment (Arber et al., 2016). Only less than half of younger than 60 year-old adults and only approximately 10 % of older patients are successfully cured (Dohner et al., 2015).

Thus, it is necessary to develop new approaches for the treatment of these myeloid leukemia types. Since genetic aberrations cooperate with epigenetic changes, epigenetic therapy might be an important and powerful cancer treatment approach (Ahuja et al., 2016). Also, it was demonstrated that chemotherapy-resistant acute myeloid leukemia cells have upregulated oxidative phosphorylation (Farge et al., 2017).

The aim of this study was to elucidate molecular mechanisms in human myeloid leukemia cells using epigenetic and metabolic regulators.

Main tasks:

1. To evaluate the ability of natural bioactive agent EGCG to cause epigenetic changes, cell cycle arrest, apoptosis and cellular senescence in acute promyelocytic leukemia and chronic myeloid leukemia cells.

2. To determine epigenetic changes caused by EHMT2/G9A histone methyltransferase synthetic inhibitor BIX-01294 and its impact on the destiny of acute promyelocytic leukemia and chronic myeloid leukemia cells.

3. To investigate the potential of histone deacetylase and histone methyltransferase inhibitors to enhance standard acute promyelocytic leukemia therapy.

4. To evaluate therapy-resistant acute myeloid leukemia patients' cell metabolic activity, proliferation and proteome changes after cell treatment with oxidative phosphorylation inhibitors.

First, we evaluated the effect of epigenetic modifiers EGCG (epigallocatechin-3-gallate) and BIX-01294 (1-benzylpiperidin-4-yl)-6,7-dimethoxy-2-(4-methyl-1,4-diazepan-1-yl)quinazolin-4-amine) on acute promyelocytic leukemia and chronic myeloid leukemia cells. EGCG is the most abundant bioactive polyphenol in green tea (*Camellia sinensis*). Among many of its known activities, EGCG has also been shown to act as an epigenetic modifier: it features DNA methyltransferase (DNMT) and histone deacetylase (HDAC) inhibitory activities (Khan et al., 2015). BIX-01294 is a synthetic inhibitor of EHMT2/G9A histone methyltransferase, which catalyzes the dimethylation of H3K9 (Kubicek et al., 2007).

We evaluated the effect of EGCG on acute promyelocytic leukemia cell lines NB4, HL60 and chronic myeloid leukemia cell line K562, whereas BIX-01294 effect was tested on cell lines NB4 and K562. Cell proliferation and survival were determined by trypan blue exclusion test. In order to evaluate EGCG and BIX-01294 effect on cell cycle progression, we examined gene expression changes of cell cycle inhibitors *p21*, *p27*, *PCAF*, *Rb* and activator *CCNA2* by RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction) and we performed standard propidium iodide method. Both tested agents impaired myeloid leukemia cell proliferation and arrested cell cycle at phase G0/G1 – acute promyelocytic leukemia cells showed higher sensitivity (publications 1 and 2). Moreover, EGCG and BIX-01294 induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells as determined by Annexin V / propidium iodide test. K562 cells remained apoptosis resistant (publication 2).

We also demonstrated that EGCG induced cellular senescence in both acute promyelocytic leukemia and chronic myeloid leukemia cells: not only arrested cell cycle, but also caused up-regulation of *ATM* and *HMGA2*,

phosphorylation of ATM and elevated number of senescence associated β -galactosidase positive cells. Meanwhile, BIX-01294 did not demonstrate this effect (although it caused cell cycle arrest and up-regulation of *HMGA2*, but neither up-regulation nor phosphorylation of ATM was extensive and it had no effect on senescence associated β -galactosidase positive cell staining) (publication 2). Moreover, both tested epigenetic modifiers caused chromatin remodeling. As determined by RT-qPCR and Western blot, EGCG caused anti-cancerous epigenetic changes in acute promyelocytic leukemia cells: reduced levels of histone modifications H3K9me2 and H3K9me3, down-regulated protein/gene expression of PRC2, HP1 α , DNMT1 and HDAC1/2. In addition, using ChIP-qPCR (chromatin immunoprecipitation-qPCR) method, we revealed rearrangement of histone modifications H3K14Ac and H4hyperAc throughout chromatin after NB4 cell treatment with EGCG (enhanced binding to the promoter regions of cell cycle and differentiation related genes *p27*, *PCAF*, *CEBPA*, *CEBPE* and reduced binding to the promoters of PRC2 components) (publications 1 and 2). BIX-01294 caused epigenetic changes (reduced PRC2, Hp1 α , DNMT1 protein levels) in both acute promyelocytic leukemia and chronic myeloid leukemia cells (publication 2). Thus, both EGCG and BIX-01294 might be useful for the development of new myeloid leukemia treatment strategies.

At the next stage of the study, we evaluated 3-deazaneplanocin A (histone methyltransferase inhibitor) and belinostat (histone deacetylase inhibitor) potential to enhance conventional acute promyelocytic leukemia treatment (retinoic acid + idarubicin). As mentioned above, acute promyelocytic leukemia is characterized by PML-RAR α protein (Kakizuka et al., 1991). This protein binds to DNA, multimerizes, recruits various other proteins and forms a large protein complex. Among recruited complex proteins, there are various chromatin regulators such as histone deacetylases, histone methyltransferases, DNA methyltransferases and Polycomb repressive complexes (PRC1 and PRC2) (Arteaga et al., 2015). Thus, combined therapy that targets not only PML-RAR α protein but also other abnormal complex components (for example histone methyltransferases and histone deacetylases) could potentially enhance the effect of standard therapy. Histone deacetylase inhibitor belinostat is already approved by Food and Drug Administration (FDA) for relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma treatment (O'Connor et al., 2015). 3-Deazaneplanocin A is an inhibitor of S-adenosyl-L-methionine dependent histone

methyltransferases, including EZH2. Preclinical studies demonstrated that it inhibited cell proliferation and caused apoptosis in various cancer types (Gaudichon et al., 2014; Shen et al., 2015).

We used the combination of belinostat, 3-deazaneplanocin A, retinoic acid and idarubicin for the treatment of NB4 cell line, HL60 cell line and white mononuclear cells from *PML-RARA* translocation-possessing patient's bone marrow. Combined treatment had higher effect on cell proliferation inhibition and on apoptosis induction. In addition, oxidative phosphorylation rate and glycolysis rate were reduced at higher extent as measured using Agilent Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer. Nitro blue tetrazolium test revealed that enhanced treatment accelerated granulocytic differentiation of patient's promyelocytes. Western blot results demonstrated significantly increased acetylation of histones H3K14 and H4 after the treatment (publication 3). Such chromatin remodeling is associated with chromatin relaxation and enhanced transcription, thus, it might upregulate genes important for leukemia treatment. Taken together, we demonstrated that 3-deazaneplanocin A and belinostat enhanced conventional treatment (retinoic acid + idarubicin) for acute promyelocytic leukemia *in vitro* (in cell lines) and *ex vivo* (in patient's blasts).

We also examined the effect of metabolism modulators on acute myeloid leukemia cells. It was demonstrated recently that chemoresistant acute myeloid leukemia cells have a higher level of oxidative phosphorylation (Farge et al., 2017). Thus, we aimed to evaluate the effect of oxidative phosphorylation inhibitors metformin and atovaquone on therapy-resistant acute myeloid leukemia patients' cells. Metformin is a widely used antidiabetic drug, which was reported to have anti-cancerous activities; it inhibits mitochondrial complex I in electron transfer chain (Wheaton et al., 2014). Antimalarial drug atovaquone acts as an analogue of ubiquinone; thus, it inhibits the activity of mitochondrial complex III. It was also demonstrated to have anti-cancerous properties (Fiorillo et al., 2016).

We obtained peripheral blood samples from therapy-resistant acute myeloid leukemia patients and from healthy donors and evaluated metabolic activity of purified mononuclear cells using Agilent Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer. The results demonstrated that leukemic cells from different therapy-resistant acute myeloid leukemia patients possess different metabolic states. Selected different metabolic state possessing cell samples were treated with metformin, atovaquone and with their various

combinations with cytarabine (chemotherapeutic agent; cytosine analogue) and venetoclax (BCL-2 inhibitor and, thus, apoptosis inducer). We demonstrated that metformin decreased oxidative phosphorylation in all tested patients' cell samples; co-treatment with cytarabine and venetoclax slightly increased the effect. Meanwhile, atovaquone did not have a marked effect in our experiments (publication 4).

After the treatment with metformin and its combination with cytarabine and venetoclax, we evaluated cell proliferation and analyzed gene expression of cell cycle inhibitors *p53*, *p21*, *Rb* and cell cycle activator *CCNA2*. Cell treatment had only a slight effect on cell proliferation and on cell cycle related gene expression. Slightly stronger effect on cell proliferation inhibition was determined after the treatment with the combination of metformin, cytarabine, and venetoclax. Moreover, a slightly higher effect on cell proliferation and cell cycle regulation was demonstrated in the cells with higher initial oxidative phosphorylation rate. However, differences among the cells with different oxidative phosphorylation are not statistically significant; thus, broader studies are required. Proteome analysis by liquid chromatography–mass spectrometry demonstrated that chemoresistant acute myeloid leukemia cell treatment with metformin modulated metabolic pathways; its combination with cytarabine and venetoclax boosted the effect (publication 4). Thus, we suggest that oxidative phosphorylation inhibition is not sufficient for therapy-resistant acute myeloid leukemia treatment; however, it causes anti-cancerous changes that might have an important additive role in combinatory treatment. For example, oxidative phosphorylation inhibitors could be combined with epigenetic modulators.

Taken together, all our tested chemical agents and their combinations effectively cause anti-cancerous molecular changes in myeloid leukemia cells. However, different genetic and epigenetic abnormalities require different treatment approaches; thus, every patient requires precise therapy.

Conclusions:

1. Bioactive green tea polyphenol EGCG inhibits acute promyelocytic leukemia and chronic myeloid leukemia cell proliferation, arrests cell cycle at phase G0/G1, causes cellular senescence. In addition, it induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis and causes anti-cancerous changes of histone modifications' and epigenetic regulators' levels (reduced levels of histone modifications H3K9me2 and H3K9me3, down-regulated

protein/gene expression of PRC2, HP1 α , DNMT1, HDAC and rearrangement of histone modifications H3K14Ac and H4hiperAc) *in vitro*.

2. EHMT2/G9A histone methyltransferase inhibitor BIX-01294 impairs cell proliferation, arrests cell cycle, causes anti-cancerous down-regulation of epigenetic regulators PRC2, Hp1 α , DNMT1 in acute promyelocytic leukemia and in chronic myeloid leukemia cells and it induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells *in vitro*.

3. Histone methyltransferase inhibitor 3-deazaneplanocin A and histone deacetylase inhibitor belinostat enhances conventional treatment (retinoic acid + idarubicin) for acute promyelocytic leukemia *in vitro* and *ex vivo*: they caused chromatin remodeling and enhanced the ability of standard therapy to inhibit cell proliferation, induce apoptosis and cause granulocytic differentiation.

4. Oxidative phosphorylation inhibitor metformin either alone or in combination with cytosine analogue cytarabine and apoptosis inducer venetoclax has only slight effect on therapy-resistant acute myeloid leukemia patients' cell proliferation inhibition *ex vivo*. However, such treatment modulates expression levels of proteins taking part in metabolic, apoptotic and cell cycle related pathways, which might be useful in combinations with other therapeutics.

REZULTATŲ VIEŠINIMAS

Stendiniai pranešimai tarptautinėse konferencijose:

1. **Vitkevičienė A.**, Skiauterytė G., Stoškus M., Gineikienė E., Žučenka A., Griškevičius L., Navakauskienė R. (2018). Combined epigenetic therapy with HMT and HDAC inhibitors caused acute promyelocytic leukemia cell differentiation and apoptosis *in vitro* and *ex vivo*. 43rd FEBS Congress: Biochemistry Forever (Praha, Čekija).

2. **Vitkevičienė A.**, Janulis V., Stoškus M., Gineikienė E., Žučenka A., Griškevičius L., Navakauskienė R. (2018). Oxidative phosphorylation activity changes in treatment resistant acute myeloid leukemia. XV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society (Dubingiai, Lietuva).

3. **Virkšaitė A.**, Skiauterytė G., Stoškus M., Gineikienė E., Žučenka A., Griškevičius L., Navakauskienė R. (2018). Epigenetic agents 3-Deazaneplanocin A and Belinostat in combination with Retinoic acid modulate the granulocytic differentiation of APL cells *in vitro* and *ex vivo*. 4th International Conference on Hematologic Malignancies at Older Age: Biology and Therapy (Mandelieu, Prancūzija).

4. **Virkšaitė A.**, Bakšienė S., Navakauskienė R. (2017). BIX-01294 causes cell cycle arrest and epigenetic changes in myeloid leukemia cells. EACR-FEBS advanced lecture course: Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer (Spetses, Graikija).

5. **Virkšaitė A.**, Bakšienė S., Navakauskienė R. (2017). Epigenetic modulator EGCG causes cellular senescence in acute and chronic myeloid leukemia cells. EMBO conference: Chromatin and Epigenetics (Haidelbergas, Vokietija).

6. **Virkšaitė A.**, Bakšienė S., Navakauskienė R. (2016). Assessment of apoptosis and senescence in acute myeloid leukemia NB-4 cells treated with epigenetic modifiers EGCG and BIX-01294. 28th EORTCNCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (Miunchenas, Vokietija).

7. **Virkšaitė A.**, Bakutyte S., Navakauskienė R. (2016). Epigenetic changes and senescence in acute myeloid leukemia cells caused by epigallocatechin-3-gallate. XIV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society (Druskininkai, Lietuva).

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė: Aida Vitkevičienė (buv. Virkšaitė)

Išsilavinimas:

- 2015-2019: Biochemijos mokslo krypties doktorantūra; Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biochemijos institutas, Lietuva
- 2010-2012: Genetikos magistras (Cum Laude); Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Lietuva
- 2006-2010: Biologijos bakalauras (Molekulinė biologija); Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Lietuva

Darbo patirtis:

- 2015-2020: Specialistė / jaunesnioji mokslo darbuotoja; Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biochemijos institutas, Lietuva
- 2012-2015: Jaunesnioji mokslo darbuotoja / mokslo darbuotoja; Thermo Fisher Scientific Baltics, Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centras, Lietuva
- 2008-2012: Profesinė praktika; Thermo Fisher Scientific Baltics, Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros centras, Lietuva

Dalyvavimas moksliniuose projektuose

- Gydimui atsparios depresijos fiziologinių požymių ir dinamikos tyrimas: biožymenų paieška. Projekto Nr. MSF-LMT-6
- Pacientui savitos plaučių vėžio heterogeninių ląstelių *ex vivo* modelinės sistemos sukūrimas priešvėžinių vaistų parinkimui personalizuotam gydymui. Projekto Nr. 01,2,2-LMT-K-718-01-0072
- Molekulinių veiksnių vaidmuo hematologinės sistemos reguliavime ląstelinio senėjimo, diferenciacijos ir regeneracijos metu. Projekto Nr. SEN-12/2015

Dalyvavimas mokomuosiuose kursuose

- 2019 spalio 02-04: „The First COST SPRINT Training School“ apie placentos darinius; Msida, Malta
- 2017 spalio 04-06: „Drug Discovery and Development“; Novartis Campus, Bazelis, Šveicarija

PADĖKA

Didžiausią padėką norėčiau skirti savo mokslinio darbo vadovei prof. dr. Rūtai Navakauskienei. Visų pirma už tai, kad patikėjo manimi ir suteikė galimybę studijuoti doktorantūrą jos vadovaujamoje laboratorijoje. Taip pat dėkoju už suteiktas žinias ir naudingus patarimus, už optimizmą bei nuoširdų palaikymą.

Taip pat dėkoju visam Ląstelės molekulinės biologijos skyriaus kolektyvui. Už šiltą atmosferą bei už nuoširdų bendradarbiavimą ir pagalbą. Ypatingas ačiū laboratorijos draugėms dr. Monikai Gasiūnienei, dr. Giedrei Valiulienei, Aistei Zentelytei ir Deimantei Žukauskaitei, kad šis vingiuotas, pakilimų ir nuosmukių kupinas kelias buvo lengvesnis, linksmesnis ir spalvingesnis negu būtų buvęs be jų.

Esu dėkinga ir savo globotiems bakalauro bei magistro studijų studentams Sandrai Bakšienei, Vytautui Januliui ir Giedrei Skliutei. Ne tik už tai, kad padėjo man lavinti mentorystės įgūdžius bei kantrybę, bet ir už svarų prisidėjimą prie šiamo darbe aptariamų rezultatų.

Ačiū artimiausiems. Už besąlygišką palaikymą, supratingumą ir tikėjimą manimi.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S.S., Maniati, M., Karimian, A., 2018. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*. 69, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.008>
- Adams, J., Nassiri, M., 2015. Acute Promyelocytic Leukemia: A Review and Discussion of Variant Translocations. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 139, 1308–1313. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0345-RS>
- Ahuja, N., Sharma, A.R., Baylin, S.B., 2016. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annu. Rev. Med.* 67, 73–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-111314-035900>
- Aliouat-Denis, C.-M., Dendouga, N., Van den Wyngaert, I., Goehlmann, H., Steller, U., van de Weyer, I., Van Slycken, N., Andries, L., Kass, S., Luyten, W., Janicot, M., Vialard, J.E., 2005. p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol. Cancer Res.* 3, 627–634. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0121>
- Anantaraju, H.S., Battu, M.B., Viswanadha, S., Sriram, D., Yogeewari, P., 2016. Cathepsin D inhibitors as potential therapeutics for breast cancer treatment: Molecular docking and bioevaluation against triple-negative and triple-positive breast cancers. *Mol. Divers.* 20, 521–535. <https://doi.org/10.1007/s11030-015-9645-8>
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., Vardiman, J.W., 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Arteaga, M.F., Mikesch, J.-H., Fung, T.-K., So, C.W.E., 2015. Epigenetics in acute promyelocytic leukaemia pathogenesis and treatment response: A TRANSition to targeted therapies. *Br. J. Cancer* 112, 413–418. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.374>
- Ashton, T.M., Fokas, E., Kunz-Schughart, L.A., Folkes, L.K., Anbalagan, S., Huether, M., Kelly, C.J., Pirovano, G., Buffa, F.M., Hammond, E.M., Stratford, M., Muschel, R.J., Higgins, G.S., McKenna, W.G., 2016. The anti-malarial atovaquone increases radiosensitivity by alleviating tumour hypoxia. *Nat. Commun.* 7, 12308. <https://doi.org/10.1038/ncomms12308>
- Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Kantarjian, H.M., Kim, D.-W., Larson, R.A., Lipton, J.H., Mahon, F.-X., Martinelli, G., Mayer, J., Muller, M.C., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J.P., Rousselot, P., Saglio, G., Saussele, S., Schiffer, C., Silver, R., Simonsson, B., Steegmann, J.-L., Goldman, J.M., Hehlmann, R., 2013. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122, 872–884. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>
- Balasubramanian, S., Adhikary, G., Eckert, R.L., 2010. The Bmi-1 polycomb

- protein antagonizes the (-)-epigallocatechin-3-gallate-dependent suppression of skin cancer cell survival. *Carcinogenesis* 31, 496–503. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp314>
- Bates, D., Eastman, A., 2017. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83, 255–268. <https://doi.org/10.1111/bcp.13126>
- Blair, H.A., 2018. Daunorubicin/Cytarabine Liposome: A Review in Acute Myeloid Leukaemia. *Drugs* 78, 1903–1910. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1022-3>
- Britschgi, A., Simon, H.-U., Tobler, A., Fey, M.F., Tschan, M.P., 2010. Epigallocatechin-3-gallate induces cell death in acute myeloid leukaemia cells and supports all-trans retinoic acid-induced neutrophil differentiation via death-associated protein kinase 2. *Br. J. Haematol.* 149, 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08040.x>
- Campisi, J., d’Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Chang, B.-D., Broude, E. V, Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., Roninson, I.B., 1999. A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents. *Cancer Res.* 59, 3761–3767.
- Chen, J., 2016. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026104–a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>
- Chen, J., Huang, C., Zhu, Y., Dong, L., Cao, W., Sun, L., Sun, H., Wan, D., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, C., 2015. Identification of similarities and differences between myeloid and lymphoid acute leukemias using a gene-gene interaction network. *Pathol. Res. Pract.* 211, 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.07.007>
- Chen, J.J., Ye, Z.-Q., Koo, M.W.L., 2004. Growth inhibition and cell cycle arrest effects of epigallocatechin gallate in the NBT-II bladder tumour cell line. *BJU Int.* 93, 1082–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2004.04785.x>
- Chhikara, B.S., Parang, K., 2010. Development of cytarabine prodrugs and delivery systems for leukemia treatment. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 1399–1414. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.527330>
- Chopra, M., Bohlander, S.K., 2015. Disturbing the histone code in leukemia: translocations and mutations affecting histone methyl transferases. *Cancer Genet.* 208, 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.10.005>
- Davis, A.S., Viera, A.J., Mead, M.D., 2014. Leukemia: an overview for primary care. *Am. Fam. Physician* 89, 731–738.
- Dawson, M.A., Kouzarides, T., 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- De Kouchkovsky, I., Abdul-Hay, M., 2016. „Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update“. *Blood Cancer J.* 6, e441–e441. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>
- Deininger, M.W.N., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J.M., Melo, J. V, 2000. Tyrosine Kinase Activity Regulates the Expression of Multiple Genes Implicated in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer*

- Res. 60, 2049–2055.
- Ding, J., Li, T., Wang, X., Zhao, E., Choi, J.-H., Yang, L., Zha, Y., Dong, Z., Huang, S., Asara, J.M., Cui, H., Ding, H.-F., 2013. The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation. *Cell Metab.* 18, 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.004>
- Dohner, H., Weisdorf, D.J., Bloomfield, C.D., 2015. Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 373, 1136–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., Hrabeta, J., 2017. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1414. <https://doi.org/10.3390/ijms18071414>
- Estève, P.-O., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F., Pradhan, S., 2006. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev.* 20, 3089–3103. <https://doi.org/10.1101/gad.1463706>
- Estey, E., 2016. Acute myeloid leukemia: 2016 Update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 91, 824–846. <https://doi.org/10.1002/ajh.24439>
- Farge, T., Saland, E., de Toni, F., Aroua, N., Hosseini, M., Perry, R., Bosc, C., Sugita, M., Stuani, L., Fraisse, M., Scotland, S., Larrue, C., Boutzen, H., Feliu, V., Nicolau-Travers, M.-L., Cassant-Sourdy, S., Broin, N., David, M., Serhan, N., Sarry, A., Tavitian, S., Kaoma, T., Vallar, L., Iacovoni, J., Linares, L.K., Montersino, C., Castellano, R., Griessinger, E., Collette, Y., Duchamp, O., Barreira, Y., Hirsch, P., Palama, T., Gales, L., Delhommeau, F., Garmy-Susini, B.H., Portais, J.-C., Vergez, F., Selak, M., Danet-Desnoyers, G., Carroll, M., Recher, C., Sarry, J.-E., 2017. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 7, 716–735. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0441>
- Fiorillo, M., Lamb, R., Tanowitz, H.B., Mutti, L., Krstic-Demonacos, M., Cappello, A.R., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2016. Repurposing atovaquone: targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells. *Oncotarget* 7, 34084–34099. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9122>
- Fiskus, W., Wang, Y., Sreekumar, A., Buckley, K.M., Shi, H., Jillella, A., Ustun, C., Rao, R., Fernandez, P., Chen, J., Balusu, R., Koul, S., Atadja, P., Marquez, V.E., Bhalla, K.N., 2009. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 114, 2733–2743. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213496>
- Gan, R.-Y., Li, H.-B., Sui, Z.-Q., Corke, H., 2016. Absorption, Metabolism, Anti-Cancer Effect and Molecular Targets of Epigallocatechin Gallate (EGCG): An Updated Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 19, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1231168>
- Gaudichon, J., Milano, F., Cahu, J., DaCosta, L., Martens, A.C., Renoir, J.-M., Sola, B., 2014. Deazaneplanocin A Is a Promising Drug to Kill Multiple Myeloma Cells in Their Niche. *PLoS One* 9, e107009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107009>

- Glozak, M.A., Seto, E., 2007. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26, 5420.
- Granja, A., Pinheiro, M., Reis, S., 2016. Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems for Cancer Therapy. *Nutrients* 8. <https://doi.org/10.3390/nu8050307>
- Hollingshead, L.M., Faulds, D., 1991. Idarubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* 42, 690–719. <https://doi.org/10.2165/00003495-199142040-00010>
- Huang, J., Dorsey, J., Chuikov, S., Zhang, X., Jenuwein, T., Reinberg, D., Berger, S.L., 2010. G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* 285, 9636–9641. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062588>
- Huang, Y., Zou, Y., Lin, L., Ma, X., Huang, X., 2017. Effect of BIX-01294 on proliferation, apoptosis and histone methylation of acute T lymphoblastic leukemia cells. *Leuk. Res.* 62, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.09.015>
- Hull, E.E., Montgomery, M.R., Leyva, K.J., 2016. HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *Biomed Res. Int.* 2016, 8797206. <https://doi.org/10.1155/2016/8797206>
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Struhl, K., 2011. Metformin Decreases the Dose of Chemotherapy for Prolonging Tumor Remission in Mouse Xenografts Involving Multiple Cancer Cell Types. *Cancer Res.* 71, 3196 LP – 3201. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3471>
- Jones, P.A., Issa, J.-P.J., Baylin, S., 2016. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.* 17, 630–641. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93>
- Juliusson, G., Hough, R., 2016. Leukemia. *Prog. tumor Res.* 43, 87–100. <https://doi.org/10.1159/000447076>
- Kakizuka, A., Miller, W.H.J., Umesono, K., Warrell, R.P.J., Frankel, S.R., Murty, V.V.V.S., Dmitrovsky, E., Evans, R.M., 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARA with with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66, 663–674. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90112-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90112-C)
- Kaushansky, K., Zhan, H., 2018. The regulation of normal and neoplastic hematopoiesis is dependent on microenvironmental cells. *Adv. Biol. Regul.* 69, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.06.003>
- Khan, M.A., Hussain, A., Sundaram, M.K., Alalami, U., Gunasekera, D., Ramesh, L., Hamza, A., Quraishi, U., 2015. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. *Oncol. Rep.* 33, 1976–1984. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3802>
- Kubicek, S., O’Sullivan, R.J., August, E.M., Hickey, E.R., Zhang, Q., Teodoro, M.L., Rea, S., Mechtler, K., Kowalski, J.A., Homon, C.A., Kelly, T.A., Jenuwein, T., 2007. Reversal of H3K9me2 by a Small-Molecule Inhibitor for the G9a Histone Methyltransferase. *Mol. Cell* 25, 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.017>
- Kwon, M.J., Shin, Y.K., 2011. Epigenetic regulation of cancer-associated genes in ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 983–1008. <https://doi.org/10.3390/ijms12020983>

- Law, J.C., Ritke, M.K., Yalowich, J.C., Leder, G.H., Ferrell, R.E., 1993. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk. Res.* 17, 1045–1050.
- Lee, S., Lee, J.-S., 2019. Cellular senescence: a promising strategy for cancer therapy. *BMB Rep.* 52, 35–41. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.294>
- Loh, S.W., Ng, W.L., Yeo, K.S., Lim, Y.-Y., Ea, C.-K., 2014. Inhibition of euchromatic histone methyltransferase 1 and 2 sensitizes chronic myeloid leukemia cells to interferon treatment. *PLoS One* 9, e103915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103915>
- Loscocco, F., Visani, G., Galimberti, S., Curti, A., Isidori, A., 2019. BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Front. Oncol.* 9, 939. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00939>
- Lou, Y., Ma, Y., Sun, J., Ye, X., Pan, H., Wang, Y., Qian, W., Meng, H., Mai, W., He, J.S., Tong, H., Jin, J., 2015. Evaluating frequency of PML-RARA mutations and conferring resistance to arsenic trioxide-based therapy in relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Ann. Hematol.* 94, 1829–1837. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2477-x>
- Lu, Z., Tian, Y., Salwen, H.R., Chlenski, A., Godley, L.A., Raj, J.U., Yang, Q., 2013. Histone-lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion, and DNA methylation of human neuroblastoma cells. *Anticancer. Drugs* 24, 484–493. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32835ffdbb>
- Lv, Z., Yan, X., Lu, L., Su, C., He, Y., 2018. Atovaquone enhances doxorubicin's efficacy via inhibiting mitochondrial respiration and STAT3 in aggressive thyroid cancer. *J. Bioenerg. Biomembr.* 50, 263–270. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9755-y>
- MacLean, A.L., Lo Celso, C., Stumpf, M.P.H., 2017. Concise Review: Stem Cell Population Biology: Insights from Hematopoiesis. *Stem Cells* 35, 80–88. <https://doi.org/10.1002/stem.2508>
- Maria, J., Ingrid, Z., 2017. Effects of bioactive compounds on senescence and components of senescence associated secretory phenotypes in vitro. *Food Funct.* 8, 2394–2418. <https://doi.org/10.1039/c7fo00161d>
- Martinez-Climent, J.A., Andreu, E.J., Prosper, F., 2006. Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 8, 647–663.
- Masetti, R., Biagi, C., Zama, D., Vendemini, F., Martoni, A., Morello, W., Gasperini, P., Pession, A., 2012. Retinoids in pediatric onco-hematology: the model of acute promyelocytic leukemia and neuroblastoma. *Adv. Ther.* 29, 747–762. <https://doi.org/10.1007/s12325-012-0047-3>
- Mayr, C., Wagner, A., Neureiter, D., Pichler, M., Jakab, M., Illig, R., Berr, F., Kiesslich, T., 2015. The green tea catechin epigallocatechin gallate induces cell cycle arrest and shows potential synergism with cisplatin in biliary tract cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0721-5>
- Naasani, I., Seimiya, H., Tsuruo, T., 1998. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249, 391–396.

- <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9075>
- Nandakumar, V., Vaid, M., Katiyar, S.K., 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* 32, 537–544. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq285>
- Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A., Pandolfi, P.P., 2011. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 11, 503–511. <https://doi.org/10.1038/nrc3057>
- O'Connor, O.A., Horwitz, S., Masszi, T., Van Hoof, A., Brown, P., Doorduijn, J., Hess, G., Jurczak, W., Knoblauch, P., Chawla, S., Bhat, G., Choi, M.R., Walewski, J., Savage, K., Foss, F., Allen, L.F., Shustov, A., 2015. Belinostat in Patients With Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma: Results of the Pivotal Phase II BELIEF (CLN-19) Study. *J. Clin. Oncol.* 33, 2492–2499. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.2782>
- Pan, Y.-M., Wang, C.-G., Zhu, M., Xing, R., Cui, J.-T., Li, W.-M., Yu, D.-D., Wang, S.-B., Zhu, W., Ye, Y.-J., Wu, Y., Wang, S., Lu, Y.-Y., 2016. STAT3 signaling drives EZH2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer. *Mol. Cancer* 15, 79. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0561-z>
- Provinciali, M., Cardelli, M., Marchegiani, F., Pierpaoli, E., 2013. Impact of cellular senescence in aging and cancer. *Curr. Pharm. Des.* 19, 1699–1709. <https://doi.org/10.2174/1381612811319090017>
- Rajendran, P., Ho, E., Williams, D.E., Dashwood, R.H., 2011. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin. Epigenetics* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-3-4>
- Rieger, M.A., Schroeder, T., 2012. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008250>
- Riether, C., Schürch, C.M., Ochsenein, A.F., 2015. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ.* 22, 187–198. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.89>
- Savickiene, J., Treigyte, G., Stirblyte, I., Valiulienė, G., Navakauskiene, R., 2014a. Euchromatic histone methyltransferase 2 inhibitor, BIX-01294, sensitizes human promyelocytic leukemia HL-60 and NB4 cells to growth inhibition and differentiation. *Leuk. Res.* 38, 822–829. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.04.003>
- Savickiene, J., Treigyte, G., Valiulienė, G., Stirblyte, I., Navakauskiene, R., 2014b. Epigenetic and molecular mechanisms underlying the antileukemic activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat in human acute promyelocytic leukemia cells. *Anticancer. Drugs* 25, 938–949. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000122>
- Sawyers, C.L., 1999. Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340, 1330–1340. <https://doi.org/10.1056/nejm199904293401706>
- Schwarze, S.R., Fu, V.X., Desotelle, J.A., Kenowski, M.L., Jarrard, D.F., 2005. The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* 7, 816–823.
- Sha, M., Mao, G., Wang, G., Chen, Y., Wu, X., Wang, Z., 2015. DZNep inhibits the

- proliferation of colon cancer HCT116 cells by inducing senescence and apoptosis. *Acta Pharm. Sin. B* 5, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.01.011>
- Shen, J., Su, J., Wu, D., Zhang, F., Fu, H., Zhou, H., Xu, M., 2015. Growth Inhibition Accompanied by MOB1 Upregulation in Human Acute Lymphoid Leukemia Cells by 3-Deazaneplanocin A. *Biochem. Genet.* 53, 268–279. <https://doi.org/10.1007/s10528-015-9688-7>
- Singh, B.N., Shankar, S., Srivastava, R.K., 2011. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1807–1821. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.093>
- Skrtic, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Maclean, N., Lai, C.K., Eberhard, Y., Bartoszko, J., Spagnuolo, P., Rutledge, A.C., Datti, A., Ketela, T., Moffat, J., Robinson, B.H., Cameron, J.H., Wrana, J., Eaves, C.J., Minden, M.D., Wang, J.C.Y., Dick, J.E., Humphries, K., Nislow, C., Giaever, G., Schimmer, A.D., 2011. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 20, 674–688. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.015>
- Song, X., Sheppard, H.M., Norman, A.W., Liu, X., 1999. Mitogen-activated protein kinase is involved in the degradation of p53 protein in the bryostatin-1-induced differentiation of the acute promyelocytic leukemia NB4 cell line. *J. Biol. Chem.* 274, 1677–1682. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1677>
- Sparmann, A., van Lohuizen, M., 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 846–856. <https://doi.org/10.1038/nrc1991>
- Suzuki, T., Terashima, M., Tange, S., Ishimura, A., 2013. Roles of histone methyl-modifying enzymes in development and progression of cancer. *Cancer Sci.* 104, 795–800. <https://doi.org/10.1111/cas.12169>
- Takashina, T., Kinoshita, I., Kikuchi, J., Shimizu, Y., Sakakibara-Konishi, J., Oizumi, S., Nishimura, M., Dosaka-Akita, H., 2016. Combined inhibition of EZH2 and histone deacetylases as a potential epigenetic therapy for non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.* 107, 955–962. <https://doi.org/10.1111/cas.12957>
- Tamamyian, G., Kadia, T., Ravandi, F., Borthakur, G., Cortes, J., Jabbour, E., Daver, N., Ohanian, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., 2017. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 110, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.12.004>
- Tomita, A., Kiyoi, H., Naoe, T., 2013. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int. J. Hematol.* 97, 717–725. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1354-4>
- Ullmannová, V., Stöckbauer, P., Hradcová, M., Souček, J., Haškovec, C., 2003. Relationship between cyclin D1 and p21Waf1/Cip1 during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 27, 1115–1123. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(03\)00103-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0145-2126(03)00103-6)
- Valiuliene, G., Stirblyte, I., Jasnauskaitė, M., Borutinskaite, V., Navakauskiene, R.,

2017. Anti-leukemic effects of HDACi Belinostat and HMTi 3-Deazaneplanocin A on human acute promyelocytic leukemia cells. *Eur. J. Pharmacol.* 799, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.014>
- Valiuliene, G., Treigyte, G., Savickiene, J., Matuzevicius, D., Alksne, M., Jarasiene-Burinskaja, R., Bukelskiene, V., Navakauskas, D., Navakauskiene, R., 2016. Histone modifications patterns in tissues and tumours from acute promyelocytic leukemia xenograft model in response to combined epigenetic therapy. *Biomed. Pharmacother.* 79, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.044>
- Wang, X., Lin, Q., Lv, F., Liu, N., Xu, Y., Liu, M., Chen, Y., Yi, Z., 2016. LG-362B targets PML-RAR α and blocks ATRA resistance of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 30, 1465.
- Wei, A.H., Tiong, I.S., 2017. Midostaurin, enasidenib, CPX-351, gemtuzumab ozogamicin, and venetoclax bring new hope to AML. *Blood* 130, 2469 LP – 2474. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-784066>
- Weinberg, S.E., Chandel, N.S., 2015. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem. Biol.* 11, 9–15. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1712>
- Wheaton, W.W., Weinberg, S.E., Hamanaka, R.B., Soberanes, S., Sullivan, L.B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G.M., Budigner, G.S., Chandel, N.S., 2014. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* 3, e02242. <https://doi.org/10.7554/eLife.02242>
- Wolf, D., Rotter, V., 1985. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 790–794. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.3.790>
- Wu, Y.-J., Jan, Y.-J., Ko, B.-S., Liang, S.-M., Liou, J.-Y., 2015. Involvement of 14-3-3 Proteins in Regulating Tumor Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 7, 1022–1036. <https://doi.org/10.3390/cancers7020822>
- Xenaki, G., Ontikatzte, T., Rajendran, R., Stratford, I.J., Dive, C., Krstic-Demonacos, M., Demonacos, C., 2008. PCAF is an HIF-1 α cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene* 27, 5785–5796. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.192>
- Yuan, K., Yong, S., Xu, F., Zhou, T., McDonald, J.M., Chen, Y., 2015. Calmodulin antagonists promote TRA-8 therapy of resistant pancreatic cancer. *Oncotarget* 6, 25308–25319. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4490>
- Zebisch, A., Hatzl, S., Pichler, M., Wölfler, A., Sill, H., 2016. Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia: The Role of Non-Coding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2080. <https://doi.org/10.3390/ijms17122080>
- Zhang, H.-H., Guo, X.-L., 2016. Combinational strategies of metformin and chemotherapy in cancers. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 13–26. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3037-3>
- Zhang, J., He, P., Xi, Y., Geng, M., Chen, Y., Ding, J., 2015. Down-regulation of G9a triggers DNA damage response and inhibits colorectal cancer cells proliferation. *Oncotarget* 6, 2917–2927. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2784>
- Zhang, P., Yang, X., Ma, X., Ingram, D.R., Lazar, A.J., Torres, K.E., Pollock, R.E., 2015. Antitumor effects of pharmacological EZH2 inhibition on malignant peripheral nerve sheath tumor through the miR-30a and KPNB1 pathway.

- Mol. Cancer 14, 55. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0325-1>
- Zhang, X., Min, K.-W., Wimalasena, J., Baek, S.J., 2012. Cyclin D1 degradation and p21 induction contribute to growth inhibition of colorectal cancer cells induced by epigallocatechin-3-gallate. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138, 2051–2060. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1276-1>
- Zhu, Q.-N., Renaud, H., Guo, Y., 2018. Bioinformatics-based identification of miR-542-5p as a predictive biomarker in breast cancer therapy. *Hereditas* 155, 17. <https://doi.org/10.1186/s41065-018-0055-7>

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-01513 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.