

Utjecaj spoja GSK-J4 na aktivnost gena KDM6B u tri linije stanica podrijetlom od zloćudnih tumora čovjeka

Radić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:952829>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-21**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
„Biotehnologija u medicini“

Ivana Radić

**Utjecaj spoja GSK-J4 na aktivnost gena KDM6B u tri linije stanica
podrijetlom od zloćudnih tumora čovjeka**

Diplomski rad

Rijeka, 2024. godine

Mentor: izv. prof. dr. sc. Koraljka Gall Trošelj, dr. med.

Komentor: izv. prof. dr. sc. Igor Jurak

SAŽETAK

Epigenetičke promjene su pokazane kao nositelji ključne uloge u tumorigenezi i širenju tumora. Jedna od glavnih epigenetičkih promjena u tumorskim stanicama je promjena razine modifikacija kromatina poput metilacije lizina 27 u histonu H3 (H3K27) što doprinosi promjeni strukture kromatina i transkripcijskoj aktivnosti mnogih važnih gena. Važni regulatori stanja modifikacija histona su enzimi poput EZH2 i JMJD3 koji u stanicama imaju antagonističko djelovanje te su povezani s raznim vrstama tumora pa tako predstavljaju važnu terapeutsku metu. Glavni inhibitori tih enzima su spojevi poput GSK-J4, inhibitor JMJD3, i tazemetostat, inhibitor EZH2. Ovi spojevi su pokazali obećavajuće rezultate u zaustavljanju epigenetičkih mehanizama koji podržavaju rast tumora mijenjajući njihov epigenetički okoliš te imaju puno slabiji sistemski učinak na organizam za razliku od konvencionalnih terapija poput cisplatine. U ovom istraživanju analiziran je utjecaj GSK-J4 i tazemetostata na ispoljenost proteina JMJD3 te transkripcijskih faktora SP1 i STAT3 u tri stanična modela raka s kombiniranim dodavanjem cisplatine kako bi istražili mogućnost senzibilizacije. Rezultati pokazuju djelomičan utjecaj primjene GSK-J4 na promjenu ispoljenosti JMJD3 proteina te SP1 i STAT3, uzimajući u obzir da većina ovih promjena može biti povezana s korištenjem cisplatine u eksperimentima. Također, otkrili smo značajnu promjenu ekspresije pSTAT3 proteina u jezgrama stanica raka nakon primjene tazemetostata, iako nije postignuta statistička značajnost u tim promjenama. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjeli specifični mehanizmi djelovanja ovih inhibitora i njihov potencijal u terapiji raka, posebno u kontekstu epigenetičkih promjena koje doprinose razvoju bolesti.

SUMMARY

Changes in the epigenetic environment have been shown to play a crucial role in tumorigenesis and the subsequent spread of tumors. One of the primary epigenetic alterations in tumor cells involves changes in chromatin modifications such as H3K27 methylation, altering chromatin structure and transcriptional activity of many crucial genes. Key regulators of histone modification states are enzymes like EZH2 and JMJD3, which exhibit antagonistic actions in cells and are associated with numerous types of tumors, thus representing important therapeutic targets. Major inhibitors of these enzymes include compounds like GSK-J4, an inhibitor of JMJD3, and tazemetostat, an inhibitor of EZH2. These compounds have shown promising results in disrupting epigenetic mechanisms that support tumor growth by altering their epigenetic landscape and have much less systemic impact on the body compared to conventional therapies like cisplatin. In this study, we analyzed the impact of GSK-J4 and tazemetostat on the expression of JMJD3 protein and the expression of SP1 and STAT3 transcription factors in three cancer cell models with combined addition of cisplatin to investigate the potential for sensitization. Our results show a partial effect of GSK-J4 on changing JMJD3 protein expression and the expression of SP1 and STAT3, considering that most of these changes may be associated with the use of cisplatin in the experiments. Additionally, we observed a significant change in pSTAT3 protein expression in the nuclei of cancer cells after tazemetostat treatment, although statistical significance was not achieved in these changes. These findings suggest the need for further research to better understand the specific mechanisms of action of these inhibitors and their potential in cancer therapy, particularly in the context of epigenetic changes contributing to disease development.

Sadržaj

1. Uvod	5
1.1 Zloćudni tumori.....	5
1.2 Konvencionalne terapije	5
1.3. Epigenetika raka.....	6
1.4 Histonske modifikacije	8
1.5 (Dis)Regulacija H3K27 histonskih modifikacija	10
1.6 Terapeutske mete	12
1.7 Transkripcijski faktori kao važni biljezi.....	14
1.8 Prethodna istraživanja	15
2. Cilj rada	17
3. Materijali i metode.....	18
3.1 Stanične linije	18
3.2 Održavanje kulture stanica i uvjeta rasta	18
3.3 Izdvajanje i kvantifikacija proteina	19
3.4 Određivanje količine proteina metodom po Bradfordu	19
3.5 Analiza metodom western blot	20
3.6 Protutijela za Western blot	21
Tretiranje stanica.....	22
Statistička obrada podataka	23
4. Rezultati	24
4.1 Western blot	24
4.2 Kvantifikacija izraženosti proteina	28
4.3 Statistička analiza rezultata denzitometrije.....	32
5. Rasprava.....	35
6. Zaključak.....	38
Literatura.....	39

1. Uvod

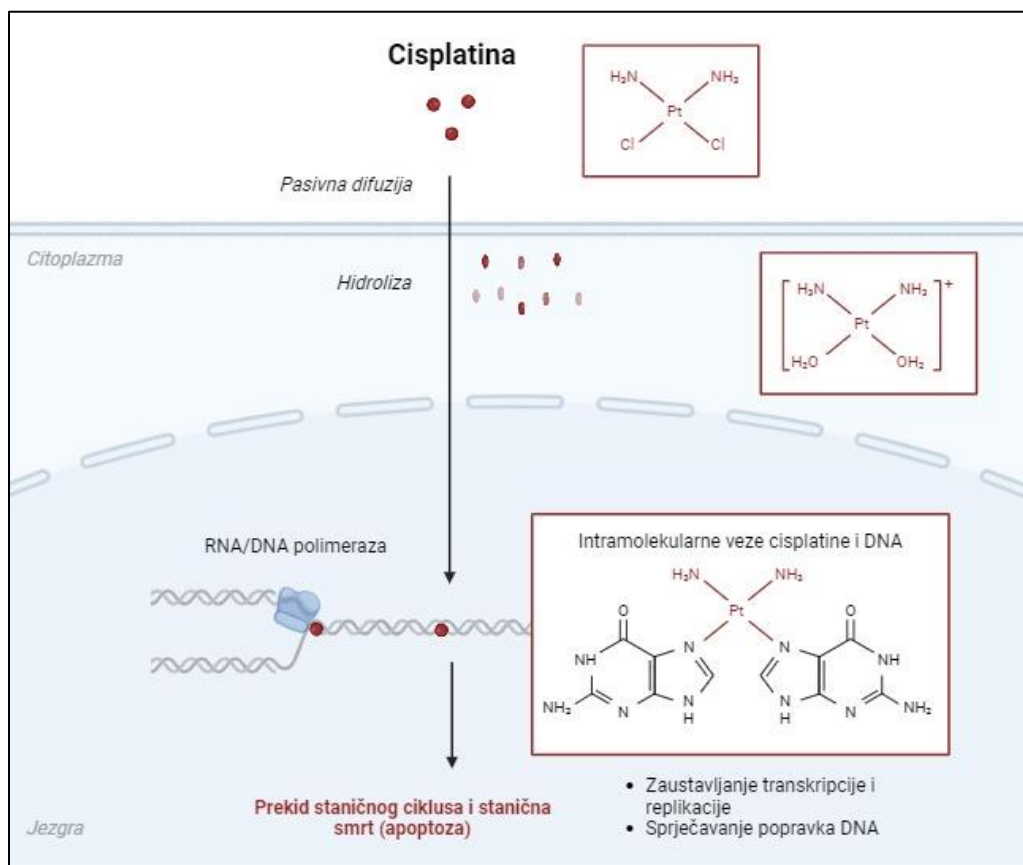
1.1 Zloćudni tumori

Povijest proučavanja raka je dugo godina bila fokusirana na identificiranje i proučavanje stabilnih promjena u genima i proteinima koji rezultiraju malignim promjena stanica, koje posljedično dovode do nastanka imunosnog bijega i razvoja raka. Glavne genetske promjene povezane sa nastankom i razvojem malignih promjena su dugo predmet istraživanja pa su tako identificirane neke glavne, često prisutne, genetske mutacije poput: TP53 koji ima ključnu ulogu u sprječavanju formiranja tumora i poticanju apoptoze te je jedan od najviše istraživanih gena povezanih sa rakom [1] ; mutacije u BRCA1 i BRCA2 genima koji sudjeluju u popravku oštećenja DNA i održavanju genomske stabilnosti te su jedni od glavnih faktora rizika od raka dojke i jajnika, i mutacije u genu za epidermalni faktor rasta (EGFR) koje rezultiraju poremećenim mehanizmom regulacije rasta stanica te se često prisutne u raku dojke i jajnika, raku pluća te su također povezani sa drugim vrstama karcinoma zbog uzrokovanja nekontrolirane proliferaciju stanica [2]. S obzirom na navedeno, očito je da je genetska podloga raka izričito velika, te do patološkog stanja mogu dovesti brojne genetske promjene zbog čega je dugi niz godina rak bio viđen kao vrsta genetske bolesti s mogućim okolišnim utjecajima.

1.2 Konvencionalne terapije

Sukladno tome, zbog agresivne prirode zloćudnih tumora, tradicionalni pristupi liječenju temeljeni se na širokom skupu terapija usmjerenih na suzbijanje rasta i širenja malignih stanica. Međutim, rak je kompleksna bolest koja obuhvaća mnoge različite vrste i podtipove koje je jako teško opisati jednim ili čak nekoliko genetskih promjene koje bi mogle pružati pouzdanu metu protutumorskih lijekova. Stoga su mnogi konvencionalni lijekovi za liječenje raka često nespecifični, djelujući na opće karakteristike, poput brze diobe stanica te gubitka sposobnosti popravka DNA [3]. Ova nespecifičnost često rezultira brojnim nuspojavama, jer lijekovi mogu utjecati i na normalne stanice koje se brzo dijele, poput stanica koštane srži i folikula dlake [4]. Jedan od glavnih i najčešće korištenih lijekova s takvim nespecifičnim kemoterapijskim učinkom je cisplatina. Glavni mehanizam djelovanja cisplatine temelji se na njezinoj sposobnosti stvaranja kovalentnih veza s DNA unutar stanica raka. Kada cisplatina uđe u stanicu, reagira s molekulama

vode u citoplazmi, stvarajući aktivni oblik koji potom ireverzibilno veže gvaninske baze prisutne na lancima DNA. Takvo vezanje dovodi do raznih promjena na molekulama DNA, kao što su intramolekularne („cross-link“) veze, koje zatim izazivaju različite oblike oštećenja u strukturi DNA, ometajući normalnu staničnu mitozu i dovodeći do stanične smrti [5].



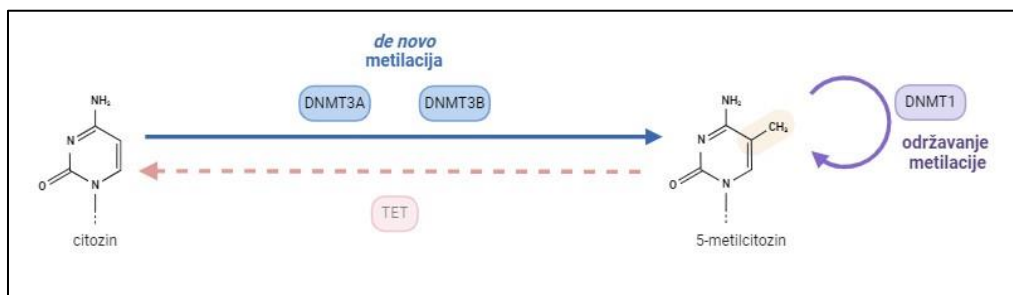
Slika 1. Mehanizam djelovanja cisplatine.

Uz nespecifičan utjecaj cisplatine na sve brzorastuće stanice u organizmu, problem ovakve terapije je također i sposobnost stanica raka na razvoj mehanizama otpornosti. Tumori mogu smanjiti unos cisplatine unutar stanica, povećati izlučivanje lijeka iz stanica, povećati popravak oštećenja DNA, aktivirati alternativne stanične putove preživljavanja te promijeniti apoptotske mehanizme [6].

1.3. Epigenetika raka

Nasuprot konvencionalnom pristupu proučavanje genetike raka, brojna nova otkrića iz polja bioinformatike i sekvenciranja su omogućila znanstvenicima proučavanje malignih promjena poput raka i tumora na jednoj potpuno novoj razini: epigenetskoj. Epigenetika je grana genetike koja proučava promjene koje se događaju na razini DNA prilikom kojih ne dolazi do promjene slijeda kodirajuće ili nekodirajuće sekvence nego samo do promjene epigenetčki biljega koji se nalaze u eukariotskim stanicama [7]. Razlika epigenetički promjena od genetskih leži u tome da su promjene na epigenomskom krajoliku privremene, te umjesto mutacija i isključivanja gena govorimo o „utišavanju“ i „aktiviranju“ gena, koji mogu biti aktivirani nekoliko puta tijekom staničnog ciklusa, vijeka stanice ili života organizma. S obzirom na brzi razvoj i nova saznanja u području, brojni stanični procesi su povezani s epigenetskom regulacijom poput embriogeneze, diferencijacije, održavanje stabilnosti genske ekspresije, reprogramiranje stanica, odgovor na okolišne utjecaje te regulacija staničnog ciklusa [8], a budući da su to isti oni procesi koji su često podložni najintenzivnijim promjenama usred kancerogeneze i transformacije normalnih u maligne stanice očita je povezanost tih fenomena [9].

Jedna od najistraživanijih i prvih otkrivenih epigenetičkih modifikacija u kontekstu raka je metilacija 5' citozina unutar CpG dinukleotida. Modifikaciju na 5-metil citozinu katalizira obitelj enzima DNA metiltransferaza (DNMT). U ljudskim stanicama postoje 3 varijante DNMT-a: DNMT1 koji održava postojeće obrasce metilacije nakon replikacije DNA te DNMT3A i DNMT3B koji su i glavni regulatori epigenetičkih promjena jer su to enzimi koji uspostavljaju metilaciju *de novo* [10]. Važnost tih gena je detaljno istražena u kontekstima embriogeneze i tumorigeneze [11], [12]. Miševi bez DNMT3B ili DNMT1 umiru tijekom embrionalnog razvoja, a miševi bez DNMT3A umiru do 4 tjedna starosti [13].



Slika 2. Metilacija 5' citozina unutar CpG dinukleotida i uloga enzima DNMT obitelji.

U normalnim stanicama, metilacija DNA događa se uglavnom u repetitivnim genomskim regijama, kao i promotorima gena koji trebaju biti inaktivirani, a većina metilacije se događa na CpG otocima – regijama gena sa izrazito velikom količinom CpG dinukleotida [10]. Metilacija DNA može inhibirati ekspresiju gena izravno, inhibirajući vezanje specifičnih transkripcijskih faktora, i neizravno, privlačeći proteine s metil-CpG-vezujućim domenama (MBD, od engl. Methyl-CpG binding domains). Proteini s MBD domenama zauzvrat regrutiraju komplekse zadužene za modifikiranje histona i remodeliranje kromatina. Povezanost između metilacije DNA i raka prvi put je pokazana čak 1983. godine, kada je utvrđeno da je na genomskoj razini DNA tumorskih stanica hipometilirana [9]. Često obilježje stanica raka je opća hipometilacija gena i hipermetilacija specifičnih promotora i CpG otoka. Hipermetilacija na specifičnim CpG otocima uzrokuje transkripcijsku inaktivaciju promotora te su često upravo ti putevi često diferencijalno metilirani u stanicama raka. Neki od primjera takvih razlika su putevi popravka DNA (poput RB1, BRCA1) [14], [15], kontrole staničnog ciklusa (p16 INK4a, CDK4/6) [16], [17], Ras signalizacije [18] i stanične regulacije apoptoze (poput p53, Caspase-8, p73) [19].

1.4 Histonske modifikacije

Uz modifikacije DNA važnu ulogu u epigenetskoj regulaciji gena i kromatinske strukture imaju histonske modifikacije. Glavni tipovi modifikacija histona uključuju metilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ubikvitinaciju, sumoilaciju i ADP-ribosilaciju.

Jedna od najvažnijih histonskih modifikacija histona H3 je na lizinu 27, poznata kao H3K27 te je često meta nekoliko tipova modifikacija, od kojih su najznačajnije H3K27ac (acetilacija lizina) i H3K27me3 (trostruka metilacija lizina). H3K27ac označava aktivnu konformaciju kromatina, obično prisutnu na aktivnim promotorima gena i genskim pojačivačima (od engl. *enhancer*). Ova modifikacija neutralizira pozitivan naboj lizina, što rezultira opuštanjem DNA molekule i otvorenijom strukturom kromatina direktno olakšavajući pristup transkripcijskim faktorima, potičući transkripciju gena. [20]

S druge strane, H3K27me3, odnosno trostruka metilacija lizina 27 na histonu H3, povezana je s zatvorenom konformacijom kromatina i igra ključnu ulogu u epigenetskom mehanizmu utišavanja odnosno smanjivanja ekspresije gena [20]. Ova histonska modifikacija rezultira dodavanjem

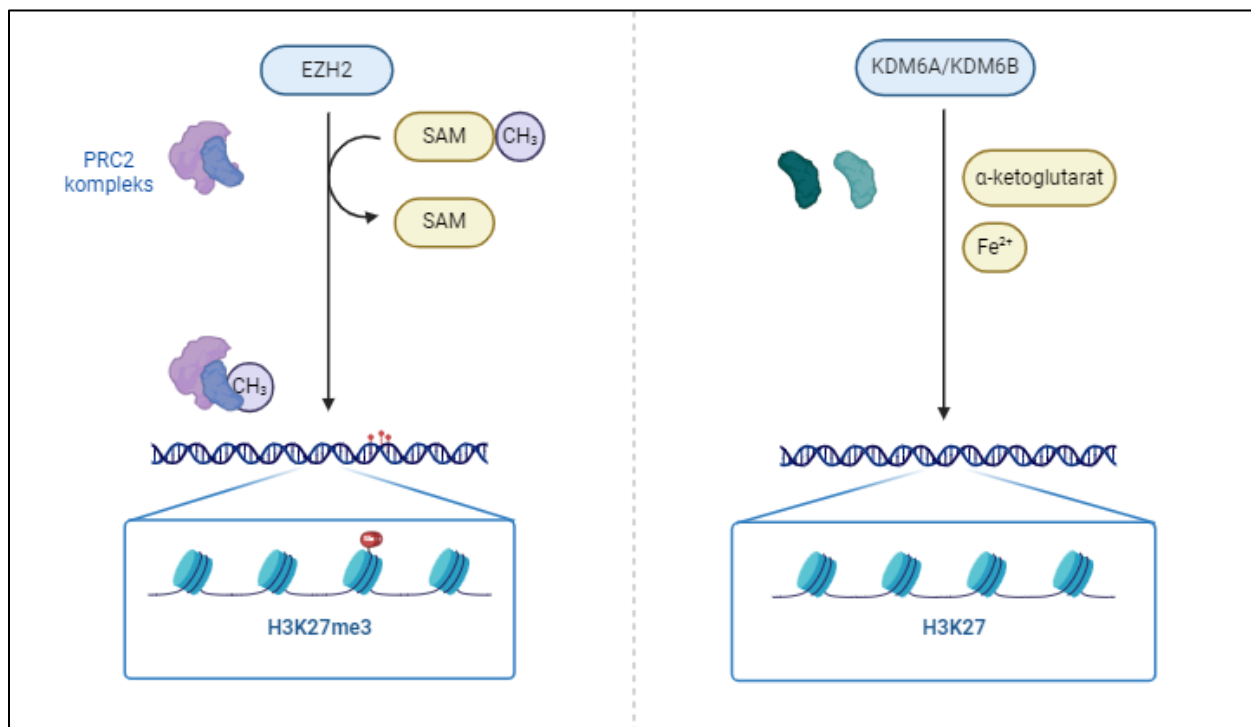
metilne skupine uz pomoć enzima EZH2 (od engl. *Enhancer of Zeste Homolog 2*), koji sa drugim proteina tvori PRC2 kompleks (od engl. *Polycomb Repressive Complex 2*) čija je glavna uloga u stanicama uspostavljanje heterokromatina odnosno takozvanog inaktivnog dijela genoma. [21]

EZH2 kao član metilaza SET obitelji histonskih metiltransferaza može mono-, di- i trimetilirati histone koristeći kofaktor S-adenozil-L-metionin u aktivnom mjestu kao izvor slobodnih metilnih skupina koje se prenose na histonske aminokiseline. Gen koji kodira za EZH2 protein se također zove *EZH2* te se nalazi na 7q36.1 genomskom lokusu. Glavni aktivatori EZH2 su druge podjedinice PRC2 kompleksa poglavito EED (od engl. *Embryonic Ectoderm Development Protein*) i SUZ12 (od engl. *Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog*) bez kojih EZH2 gubi svoju katalitičku aktivnost. Ostale podjedinice PRC2 kompleksa koje protein regrutira RbAp46/48 (od engl. *Retinoblastoma-Associated Proteins p46/p48*), JARID2 (od engl. *Jumonji/ARID Domain-Containing Protein 2*), AEBP2 (od engl. *Adipocyte Enhancer-Binding Protein 2*) i proteini PCL (od engl. *Polycomb-like Proteins*) su važni kordinatori aktivnosti te reguliraju količine metilacijske aktivnosti no nisu neophodni za aktivnost EZH2 proteina *in vitro* [22].

Kako bi se u stanicama uspostavila ravnoteža te ciljano aktiviranje i utišavanje gena putem regulacije otvorenosti kromatina, stanicama je potreban i mehanizam putem kojega će se metilacije postavljene EZH2 proteinom i ukloniti. Za to je zadužena je cijela obitelj proteina koji su zaduženi za uklanjanje metilnih skupina sa lizina: KDM6 (od engl. *Lysine Specific Demethylase 6*). Obitelj čine 3 glavna proteina, KDM6A, također poznati kao UTX (od engl. *Ubiquitously-Transcribed TPR Protein on the X Chromosome*), KDM6B također poznati kao JMJD3 (od engl. *JmjC domain-containing protein 3*) te KDM6C.

Katalitička aktivnost proteina iz obitelji KDM6 proizlazi iz domene smještene na C-terminalnom dijelu proteina i pod imenom Jumonji C. Kofaktori enzimske reakcije su ioni Fe^{2+} i α -ketoglutarat koji kataliziraju uklanjanje metilne skupine samo s lizina ostatka 27 na histonima, dok ostale metilacijske modifikacije lizina poput H3K4 ne uklanjaju. KDM6A također posjeduje 6 domena prepoznavanja ostalih proteina pod nazivom TPR (od engl. *Tetratricopeptide Repeat*) koje omogućuju interakciju sa drugim proteinima poput MLL4 (od engl. *Myeloid/lymphoid or Mixed-lineage Leukemia Protein 4*) glavni katalizator enzimske reakcije dodavanja metilne skupine na

lizin 4 (H3K4) inače povezanom sa aktivnom transkripcijom gena, pa je očito da je paralelno uklanjanje represivnog histonskog biljega i stavljanje aktivirajućeg jako bitan mehanizam regulacije aktivnosti gena. Za razliku od KDM6A, KDM6B ne posjeduje te iste TPR domene za prepoznavanje drugih proteina, te je njegovo ispoljavanje često potaknuto raznim upalnim procesima i onkogenima. U pokusima kromatinske imunoprecipitacije je pokazano da KDM6B veže promotre gena makrofaga uključene u odgovor na razne citokine, kemokine i lipopolisaharade putem aktivacije NF- κ B signalnog puta. [23]



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz mehanizma djelovanja enzima EZH2 te KDM6A i KDM6B.

1.5 (Dis)Regulacija razine metilacije H3K27

U stanicama raka često dolazi do mnogih epigenetičkih promjena koje doprinose tumorigenezi i kancerogenezi, pa su tako dokazane brojne genetske mutacije u stanicama raka koje su povezane s promjenama u uspostavljanju specifičnih epigenetičkih modifikacija važnih sa pravilno funkcioniranje stanica. Uz poznate promjene na razini metilacije DNA gdje je uviđeno da tumorske stanice imaju velik stupanj globalne hipometilacije te hipometilacije promotora raznih onkogeni. Suprotno tome, zapaženiji je fenomen da tumorske stanice često pokazuju hipermeti-

laciju upravo tumor supresorskih gena, što rezultira smanjenom ekspresijom tih gena. [24]. Uz promjene u stupnju metilacije same DNA, razina određenih histonskih modifikacija je također znatno promijenjena u određenim stanicama raka, pa je tako uočena prekomjerna metilacija lizina 9 na histonu 3 (H3K9) kao mehanizam utišavanja tumor supresorskih gena u stanicama raka mokraćnog mjehura [25], prekomjerna ekspresija određenih histonskih acetilaza povezana je s rakom prostate, dojke, debelog crijeva i želuca, dok je u nekim slučajevima otkrivena smanjena razina histonskih deacetilaza [26]. Sve to upućuje na izuzetno složen mehanizam regulacije epigenetičkih modifikacija u različitim stanicama, koji ne ovisi samo o mutacijama u pojedinih genima, već i o širokoj mreži raznovrsnih promjena koje zajedno dovode do disregulacije različitih staničnih puteva, što na kraju rezultira patološkim promjenama.

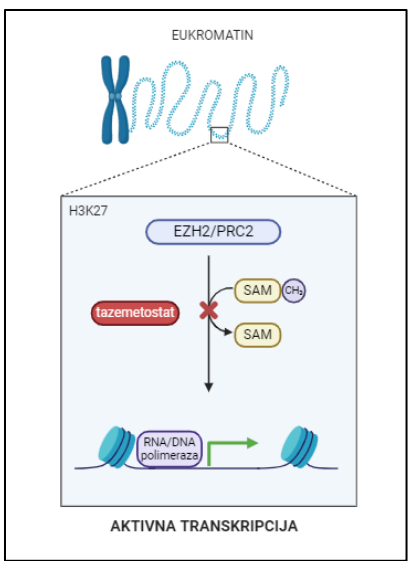
Obzirom na iznimno važnu ulogu EZH2 u uspostavljanju H3K27me represivnih biljega na razini genoma, promjene u ispoljenosti proteina dokazane su u raznim staničnim linijama poput raka dojke, prostate, endometrija, jajnika i melanoma [21], [27]. Prekomjerno ispoljavanje EZH2 često je povezano s slabije diferenciranim tumorima i/ili uznapredovalim stadijima bolesti, što sugerira složene mehanizme regulacije njegove ispoljenosti koji zahtijevaju više mutacijskih događaja. To se razlikuje od gena uključenih u ranu tumorogenezu i tumor-supresorskih gena, koji obično djeluju prema "hipotezi dva pogotka" [28]. Uz promjene razine ispoljenosti, mutacije u katalitičkoj domeni EZH2 pronađene su u određenim zloćudnim tumorima, poput mutacije tirozina 641 koja dovodi do znatnog smanjenja afiniteta za nemetilarni lizin 27 pritom povećavajući afinitet za ostale supstrate (mono- i di- metilirane lizine), koji u slučaju monoalelne mutacije može dovesti do povećane razine H3K27me₃ te utišati potencijalne tumor-supresorske gene kao i ostale gene povezane sa staničnim odgovorom na promjene prisutne u tumorskom mikrookolišu. [29]

S obzirom na to da EZH2 ima dokazanu promjenu aktivnosti u tumorskim stanicama, moguće je pretpostaviti da će i njegovi antagonisti KDM6A i KDM6B također imati značajne promjene u metabolizmu raznih tumorskih stanica. Tako je dokazano da je povećano ispoljavanje KDM6B proteina prisutno u nekim virusnim infekcijama koje mogu voditi do razvijanja tumora poput infekcija humanim papiloma virusom (HPV) gdje onkoprotein E7 u stanicama keratinocita povećava razinu transkripcije i količinu proteina KDM6A i KDM6B te tako direktno utječe na sma-

njenu razinu H3K27 u promotorskoj regiji *P16/INK4A*, tumor-supresorskog biljega za maligne promjene uzrokovane HPV-om [30]. U slučaju Epstein-Barr virusa (EBV), mutacije u genu za KDM6A među prvim su zabilježenim mutacijama u specifičnoj vrsti limfoma T-stanica. Povećana ekspresija ovog gena također je uočena u slučaju Hodgkinovog limfoma, još jednog čestog raka uzrokovanog EBV-om [31], u kojem slučaju je dokazano da inhibicija KDM6B dovodi do povećanja osjetljivosti na druge kemoterapijske lijekove [32]. Kod infekcija HTLV-1 virusom, dolazi do smanjenja ekspresije KDM6B gena, što rezultira nakupljanjem H3K27me3 histonske modifikacije u genomu, izazivajući izrazite epigenetske promjene u epigenomu stanica T-stanične leukemije [33]. Također je dokazana ključna uloga KDM6B u stanicama multiplog mijeloma, gdje je utišavanje ovog gena pomoću shRNA (od engl. *short hairpin RNA*) rezultiralo značajnim smanjenjem rasta i preživljavanja tumorskih stanica u ranim stadijima, dok u kasnijim fazama bolesti nije imalo značajan utjecaj. [34].

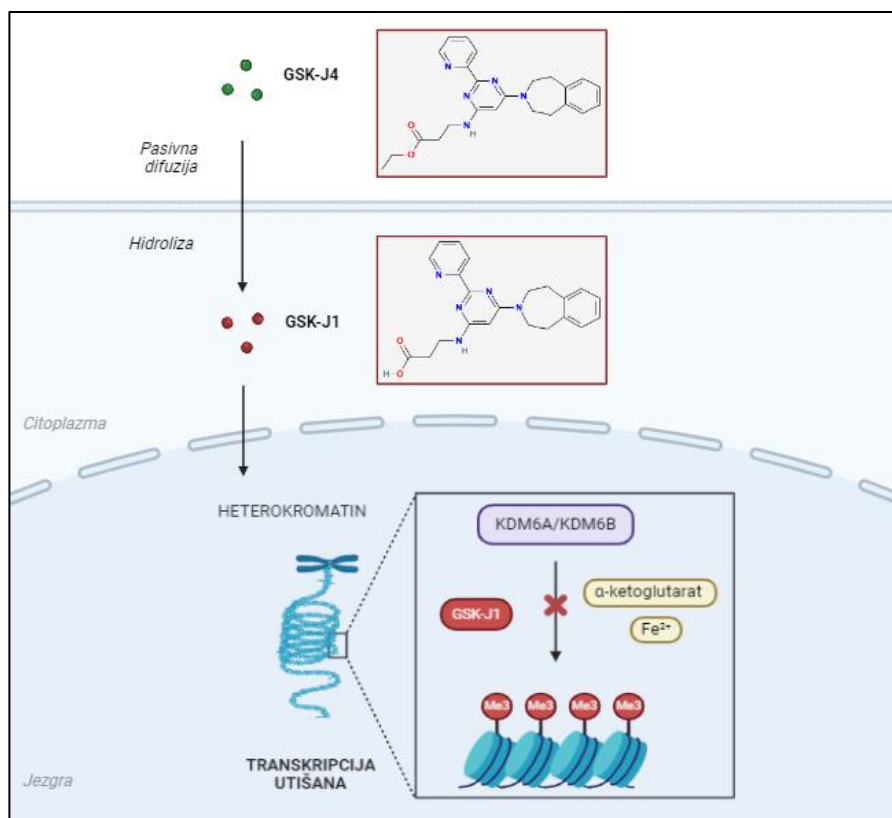
1.6 Terapeutske mete

Zbog utvrđene važnosti posttranslacijskih modifikacija H3K27 na uspostavljanje i održavanje tumorskih stanica, postoje brojna istraživanja usmjerena na razvoj terapeutskih strategija koja ciljaju ovu ključnu epigenetsku oznaku kako bi se suzbile neželjene promjene u regulaciji gena i omogućile inovativne terapeutske intervencije u borbi protiv određenih oblika karcinoma. Posljedično, razvijeni su i specifični lijekovi koji utječu na aktivnosti metiltransferaza i demetilaza sa ciljem selektivne inhibicije aktivnosti jednog odnosno drugog enzima. Među prvim razvijenim lijekovima koji ciljaju upravo uspostavljanje H3K27me3 u stanicama putem blokiranja aktivnosti EZH2 je lijek tazemetostat, tržišno poznat pod imenom Tazverik, čija je učinkovitost pokazana u raznim predkliničkim istraživanjima, *in vitro* i *in vivo*. Na primjer, pokazao je učinkovitost protiv rabdmioidnih tumora, ne-Hodgkinovog limfoma, karcinoma jajnika malih stanica, karcinoma Merkelovih stanica te hordoma [35]. Glavni mehanizam djelovanja tazemetostata je kompetitivno reverzibilno vezanje aktivnog mjesta EZH2, gdje sprječava vezanje S-adenozil-L-metionina prilikom kojeg onemogućuje prijenos metilne skupine na lizin 27. [36]



Slika 4. Utjecaj tazemetostata na djelovanje EZH2 enzima tj. PRC2 kompleksa.

S druge strane postoje i lijekovi poput GSK-J1 i njegove esterske verzije GSK-J4 koji ciljano djeluju na cijelu obitelj KDM histonskih deacilaza (uključujući KDM6A i KDM6B), inhibirajući njihovu aktivnost u stanicama raka i direktno smanjujući ekspresiju specifičnih onkogeni. Mehanizam djelovanja ova dva lijeka je putem kompetitivne inhibicije KDM aktivnog mjesta, gdje se aktivni oblik molekule GSK-J4 natječe sa α -ketoglutaratom za vezanje. GSK-J4 je u svojoj početnoj formi neaktivan jer je esterificiran, što omogućava lakši prolazak kroz staničnu membranu. Nakon ulaska u stanicu, stanične esterase u citoplazmi uklanjaju etilne skupine s molekule, čime se GSK-J4 pretvara u GSK-J1, koji je biološki aktivan oblik [37]. Protutumorsko djelovanje je dokazano na raznim staničnim modelima no još nisu istraženi utjecaju na potpunim kliničkim studijama.



Slika 5. Prikaz aktivacije GSK-J4 u GSK-J1 i mehanizam inhibicije enzima KDM6A i KDM6B.

1.7 Transkripcijski faktori kao važni biljezi

Transkripcijski faktori su ključni regulatori ekspresije gena u stanici, igrajući važnu ulogu u kontroliranju procesa transkripcije prepoznavajući specifične DNA sekvence u promotorskim regijama gena te aktiviraju ili inhibiraju proces transkripcije pomoću različitih mehanizama. Transkripcijski faktori djeluju na kompleksan način, surađujući s drugim transkripcijskim regulatorima, kao što su koaktivatori ili represori, kako bi precizno regulirali ekspresiju gena. Također, važno je da njihova aktivnost može biti regulirana raznim vanjskim ili unutarnjim signalima, pružajući stanicama jako bitan mehanizam za odgovor na promjenjive uvjete okoliša.

Protein SP1 (od engl. *Specificity Protein 1*), predstavlja ključni transkripcijski faktor u regulaciji ekspresije gena s ulogom u širokom spektru bioloških procesa, od kontroliranja rasta i diferencijacije stanica do sudjelovanja u programiranoj staničnoj smrti (apoptozu) i održavanju stabilnosti genoma [38]. Ovaj protein ostvaruje svoju funkciju povezivanjem s CpG otocima koji se nalaze u promotorskim regijama gena. Kada se SP1 veže na CpG otoke, može djelovati kao aktivator ili

repressor, potičući ili inhibirajući proces transkripcije zavisno o kontekstu ekspresije pojedinih gena. Što je još važnije, SP1 također ima sposobnost interakcije s drugim transkripcijskim faktorima i koaktivatorima, stvarajući složene regulatorne mreže unutar stanice. S obzirom na svoju važnu ulogu u regulaciji gena te povezanosti s epigenetičkim promjenama, promjene u aktivnosti ili ekspresiji proteina SP1 mogu služiti kao važan pokazatelj promjena u globalnog epigenetskog stanja u stanici. [39]

Drugi važni transkripcijski faktor u stanicama je STAT3 (od engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*). Kao posljedica odgovora na citokine i čimbenike rasta, STAT3 fosforiliraju Janus kinaze (JAK) na tirozinu 705, formira se fosforilirani STAT3 (pSTAT3) [40] prilikom čega dolazi do dimerizacije pSTAT3. Takva modifikacija omogućuje njegov prelazak u jezgru stanice. Ovaj kompleks zatim veže na specifične palindromske DNA motive TTCNNGAA (gdje je N bilo koji nukleotid), gdje aktivira ili inhibira transkripciju ciljnih gena [41]. Povezivanje dimera pSTAT3 s DNA može rezultirati povećanim ispoljavanjem onkogenih ili gena koji podržavaju stanični rast i preživljavanje. Slično kao i SP1, pSTAT3 ima važnu ulogu u staničnom odgovoru na vanjske signale, pa je tako bitan u regulaciji imunološkog odgovora, djelujući kao posrednik između vanjskih citokina i unutarnjih odgovora. Razne studije su pokazale da STAT3 u stanicama raka često bude slabije reguliran nego u normalnim stanicama, pritom aktivirajući brojne onkogene koji su pod njegovom transkripcijskom kontrolom. Također je utvrđeno da STAT3 može vezati odgovarajuće DNA sekvence samo u otvorenom kromatinu te je njegova ekspresija povezana s povećanom aktivnošću i ekspresijom proteina EZH2 u stanicama raka debelog crijeva [42] pružajući jako dobar biljeg ukupne aktivnosti EZH2, pogotovo u slučaju tretmana spojevima koji reguliraju i sprječavaju normalnu aktivnost EZH2 proteina.

1.8 Prethodna istraživanja

Na temelju prethodnih istraživanja koja su ispitivala učinke lijekova, specifičnih inhibitora ključnih enzima uključenih u trimetilaciju H3K27, provedeni su brojni eksperimenti koji su poslužili kao temelj za ovaj rad [ref]. Tako je dokazano da kombinirana primjena cisplatine i tazemetos-tata statistički značajno utječe na staničnu proliferaciju mjerenu putem osjetljivog testa ugradnje bromodeoksiuridina (BrdU) kod Detroit 562 i FaDu stanica dok kod HT 29 takav kombinirani

tretman nije imao statistički značajan utjecaj na senzibilizaciju stanica na tretman cisplatinom, štoviše došlo je do značajnog povećanja proliferacije. Također, u istom radu je analiziran i potencijalni sinergistički utjecaj GSK-J4 na senzibilizaciju tretmana cisplatinom. Stupanj proliferacije stanica je također bio određen testom ugradnje BrdU gdje je pokazan statistički značajan sinergistički učinak spoja GSK-J4 za senzibiliziranja stanica na tretman cisplatinom. Dodatno u sklopu istog eksperimenta je utvrđeno da različite stanice imaju različite stupnjeve osjetljivosti na GSK-J4, pa su se najotpornijima pokazale stanice HT 29, umjereno osjetljive su bile Detroit 562 stanice dok su FaDu stanice pokazane kao najosjetljivije na djelovanje GSK-J4.

S obzirom na navedeno ističe se važno pitanje o tome na koje stanične puteve utječe inhibicija histonske metiltransferaze EZH2 putem tazemetostata i inhibicija JMJD3 histonske demetilaze putem GSK-J4. Kao glavna potencijalna meta zbog svoje važnosti u regulaciji brojnih gena povezanih s nastankom tumora ističu se važni transkripcijski faktori već spomenuti poput SP1 i pSTAT3/STAT3 te je upravo istraživanje potencijalne promjene u ispoljenosti tih proteina ujedno i glavni cilj eksperimenata provedenih u ovom radu.

2. Cilj rada

S obzirom na dokazan potencijal spojeva GSK-J4 i tazemetostata u senzibilizaciji staničnih linija na cisplatinu, glavni cilj ovog istraživanja bio je istražiti molekularno-genetički utjecaj tih spojeva na razine izraženosti važnih transkripcijskih faktora poput STAT3/pSTAT3 i SP1 te promjene u razini izraženosti ciljne molekule spoja GSK-J4, JMJD3, kao mogućeg puta staničnog odgovora na smanjenu aktivnost tog enzima. Kako je posljedica utjecaja GSK-J4 i tazemetostata promjena stupnja metilacije histona na razini cijelog genoma i kako vezanje transkripcijskih faktora SP1 i STAT3/pSTAT3 na specifične promotore direktno ovisi o epigenetičkom okolišu, postavlja se pitanje hoće li kemijska inhibicija JMJD3 i EZH2 dovesti do promjena u razinama tih proteina u stanicama, a time i utjecati na izraženost nizvodnih proteina čija je ekspresija izravno povezana s aktivnošću SP1 i STAT3/pSTAT3.

Glavna metodologija kojom će se istraživati ovaj utjecaj je metoda Western blot te semikvantitativno mjerenje promjena u razini ispoljenosti ciljnih proteina sa ciljem pronalaska statistički značajnih razlika ispoljenosti transkripcijskih faktora STAT3/pSTAT3 i histonske demetilaze JMJD3 u ukupnoj, nuklearnoj ili citoplazmatskoj frakciji proteina izoliranih iz 3 različite stanične linije karcinoma. Stoga, specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Ustvrditi da li tretman s GSK-J4 ili tazemetostatom direktno utječe na razinu ispoljenosti JMJD3 proteina u izoliranim proteinskim frakcijama
2. Postojanje razlika u ispoljenosti STAT3/pSTAT3 i SP1 transkripcijskih biljega u izoliranim frakcijama s obzirom na tretman GSK-J4 ili tazemetostatom
3. Postoji li razlika u djelovanju GSK-J4 i tazemetostata na razinu ispoljenosti proteina s obzirom na primjenu tretmana cisplatinom te ustvrditi potencijalne sinergistične utjecaje takvih tretmana

3. Materijali i metode

3.1 Stanične linije

Za izvođenje eksperimenata u ovom istraživanju korištene se tri trajne adherentne linije stanica raka, dvije podrijetlom raka glave i vrata i jedna podrijetlom raka debelog crijeva:

1. FaDu – karcinoma donjeg dijela ždrijela
2. Detroit 562 – karcinom ždrijela
3. HT-29 – adenokarcinom debelog crijeva

Početne linije stanica su nabavljene od ATCC (American Type Tissue Collection), te pohranjene u tekućem dušiku do početka istraživanja.

3.2 Održavanje kulture stanica i uvjeta rasta

Nakon odmrzavanja prvo presađivanje svih staničnih linija bilo je u bočice površine 75cm² s ventiliranim čepom u DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mediju s 4,5 g/L glukoze uz dodatak 10% FCS u inkubatoru pri 37°C u vlažnoj atmosferi i 5% CO₂.

Nakon početnog uzgoja stanica, stanice su nasadene u manje boce u kojima su izvođeni eksperimenti tretiranja. Odvajanje stanica od podloge za potrebe pokusa rađeno je otopinom 0,25% (w/v) Trypsin-0,53mM EDTA, te zaustavljeno prenošenjem u nove 15mL epruvete u kojima se nalazio svježi DMEM medij s 10% FCS. Nakon toga otopina sa slobodnim stanicama je prebačena na centrifugiranje na 250g i 4°C u trajanju od 5 minuta kako bi se istaložile stanice. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, stanice pomiješane sa 1 mL kompletiranog medija, te alikvot od 20uL pomiješan sa 180uL 0,4% Trypan Blue Solution te stanice prebrojane koristeći Burker-Turkov hemocitometar.

3.3 Izdvajanje i kvantifikacija proteina

Obzirom kako su proučavani proteini mahom transkripcijski faktori te lokaliziraju unutar jezgre potrebno je izdvojiti samo frakciju proteina koji se nalaze unutar jezgre. Za to je korišten komercijalno dostupni komplet kemikalija „NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents“ prema uputama proizvođača.

Stanice se prvo odvojene od podloge dodatkom 2,5 mL 0.25% (w/v) Tripsin-0.53mM EDTA, čija se reakcija zaustavi dodatkom svježeg DMEM medija sa 10% FCS. Nakon toga stanice u centrifugirane 5 minuta na 500g i resuspendirane u 1mL hladnog PBS pufera, potom prebačene u 1.5 mL mikroeprevetu te je centrifugiranje i resuspendiranje ponovljeno još jednom u istim uvjetima. Nakon uklanjanja supernatanta dodan je reagens CER I, u količini koja odgovara količini taloga stanica (po naputku proizvođača). Talog je resuspendiran vorteksiranjem tijekom 15 sekundi i inkubiran na ledu 10 minuta. Nakon inkubacija dodaje se reagens CER II, uzorak resuspendira pomoću vorteksiranja od 5s, uzorak se onda inkubira na ledu 1min, ponovo vorteksiran 5s te centrifugiran 5min na 16 000 x g na 4C. U supernatantu zaostaju proteini citoplazme, te su oni uklonjeni i pohranjeni na -80°C. Talog koji ostaje se resuspendira u hladnom NER reagensu i vorteksira 15s te inkubira na ledu 10min. Isti postupak se ponavlja još 4 puta za isti uzorak, te se na kraju uzorak centrifugira 10min na 16 000 x g i na 4C. Supernatant koji sadržava proteine jezgre se potom pohranjuje na -80°C i sa njime se ide u daljnje reakcije.

3.4 Određivanje količine proteina metodom po Bradfordu

Za kvantifikaciju količine izoliranih proteina korištena je metoda po Bradfordu. Metoda se temelji na ireverzibilnom vezanju boje Coomassie brilliant blue G-250 na određene aminokiseline rezultirajući promjenom absorpcijskog spektra na 595nm. Prije početka mjerenja koncentracije izdvojenih proteina potrebno je napraviti standardnu krivulju koristeći razrjeđenja BSA poznatih koncentracija. Prvi korak je otapanje BSA u PBS puferu u koncentraciji od 10mg/mL, te su nakon toga pripremljena razrjeđenja sljedećih koncentracija: 0; 0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 te 1 mg/mL. Matična otopina 5x Bradford Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate je razrjeđena u omjeru 1:5 (5mL + 20mL). Prije mjerenja, svaki uzorak nuklearnih proteina je resuspendiran i razrijeđen 4 puta, te neposredno prije nanošenja na jažicu ponovno vorteksiran. U svaku

jažicu nanešeno je 5uL danog uzorka/standarda te 200uL Bradford reagensa te je reakcija inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Konačna apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 595nm koristeći uređaj Multiscan EX (Thermo Scientific) te su dobivene vrijednosti uspoređene sa standardnom krivuljom apsorbancije BSA poznate koncentracije i izračunate konačne vrijednosti koncentracije nuklearnih proteina.

3.5 Analiza metodom western blot

3.5.1 Elektroforeza

Izolirani i kvantificirani proteini jezgre su analizirani metodom Western blot za mjerenje razlike ekspresije pojedinih proteina između 8 različitih uzoraka. Elektroforeza proteina se odvijala na 5% sabijajućem i 10% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu uz dodatak natrij dodecil sulfata (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) kao reagensa koji omogućuje razdvajanje proteina samo po veličini, a ne po veličini i naboju. Točan sastav gelova je prikazan u tablici 5. Elektroforeza je pokrenuta koristeći aparaturu Standard TV100 u za to prikladnom puferu (1X Running Buffer, 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS).

Sastav gelova	Gel za razdvajanje (10%)	Gel za sabijanje (5%)
mQ voda	2,5 mL	2,2 mL
<i>Pufer 1 1,5M Tris-HCl, 0,4% SDS, pH 8,8</i>	1,5 mL	
<i>Pufer 2 0,5M Tris- HCl, 0,4% SDS, pH 6,8</i>		0,9 mL
<i>Akrlamid 30% akrilamid: bis-akrlamid 29:1</i>	2 mL	0,6 mL
<i>10% amonijev persulfat (APS)</i>	50 µL	50 µL
<i>Tetrametiletilendiamin (TEMED)</i>	5 µL	5 µL

Tablica 1. Kemijski sastav gelova korištenih za elektroforezu.

U svaku jažicu nanosilo se po 8ug uzorka proteina jezgre pomiješanog sa puferom za nanošenje (5X Laemmli Loading Buffer) razrijeđenog do 1X zavisno o koncentraciji proteina u pojedinom uzorku. Također prilikom svake elektroforeze nanosio se i proteinski standard (PageRuler™ Pre-stained Protein Ladder, 10 to 180 kDa; Thermo Fisher Scientific) kako bi se imao pregled veličina izoliranih proteina na gelu.

3.5.2 Prijenos

Nakon završetka elektroforeze gel se kratko uranja u 1X pufer za prijenos (od engl. Transfer Buffer ; 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% v/v metanol) te se slaže sustav za prijenos na nitroceluloznu membranu. Korištena je membrana veličine pora 0,2 μm "RotiNC, transfer membrane", te je sami transfer izvršen korištenjem instrumenta "Trans-Blot Turbo Transfer System" (Bio-Rad Laboratories, SAD) u trajanju od 10 minuta pri stalnoj jačini struje od 1,3 ampera, potom su membrane obojane 0,1% otopinom Ponceau S u octenoj kiselini za provjeru uspješnosti transferra na membranu te je višak otopine ispran destiliranom vodom.

3.5.3 Obilježavanje

Nakon uspješnog transfera proteina membrane su blokirane 5% otopinom nemasnog mlijeka u TBST (TRIS + 0,1% (v/v) Tween 20) puferu u trajanju od sat vremena, te tri puta po 5 minuta isprane u TBST puferu kako bi se uklonili svi potencijalni zaostaci i nečistoće na membrani.

Primarna protutijela za svaki od ciljnih proteina su razrijeđena po specifikacijama proizvođača u TBST puferu te inkubirana preko noći na 4°C uz stalno miješanje. Nakon inkubacije sa primarnim protutijelom membrane su isprane u čistim TBST puferom, tri puta po 5 minuta te inkubirane 1h s otopinom sekundarnog protutijela obilježenim sa peroksidazom iz hrena (Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody;). Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom membrane su opet isprane 3 puta po 5 minuta u TBST puferu te je započet korak detekcije signala kemiluminiscencijom.

Detekcija signala je rađena koristeći komercijalno dostupan SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescen Substrate (Thermo Fisher) po uputama proizvođača te su konačne slike membrana slikane uređajem Alliance Q9 mini (Uvitec) pri različitim stupnjevima ekspozicije kako bi se dobio najbolja kvaliteta slika za denzitometriju.

3.6 Protutijela za Western blot

U dolje navedenoj tablici je popis svih korištenih protutijela za obilježavanje membrana prilikom izvođenja Western blota te razrjeđenja po uputama proizvođača. Korištena su primarna protutijela za 4 ciljna proteina od interesa te 2 različita proteina kućepazitelja: Beta aktin i TBP (od engl. *TATA-Box Binding Protein*). Beta aktin je korišten za uzorke ukupnih i citoplazmatskih proteina, dok je TBP korišten za uzorke nuklearnih proteina zbog konstitutivne ispoljenosti u jezgri.

Protutijelo anti-JMJD3 nabavljeno je od Thermo Fisher Scientific (SAD). Ostala protutijela su nabavljena od XXXX. Primarna protutijela potječu od kunića, dok je sekundarno protutijelo za prepoznavanje kunićevog imunoglobulina G (IgG) dobiveno od koze.

Protein	Vrsta	Protutijelo
JMJD3	Primarno poliklonsko	JMJD3 Polyclonal Antibody #PA5-72751
SP1	Primarno monoklonsko	
pSTAT3	Primarno monoklonsko	
STAT3	Primarno monoklonsko	
TBP	Primarno monoklonsko	TBP (D5C9H) XP Rabbit mAb #44059
Beta aktin	Primarno monoklonsko	β -Actin (D6A8) Rabbit mAb #8457
IgG kunića	Sekundarno	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074

Tablica 2. Popis korištenih protutijela u istraživanju.

Tretiranje stanica

Prije tretmana sve stanice bile su namnožene u istim eksperimentalnim uvjetima: DMEM medij sa dodatkom 4,5g/L glukoze i 10% FCS. Nakon nasađivanja stanice su bile podvrgnute raznim tretmanima zavisno o eksperimentalnim uvjetima. U dolje navedenoj tablici prikazane su sve kombinacije tretmana za korištene stanice odnosno eksperimentalne skupine, što je ponovljeno za sve 3 stanične linije korištene u istraživanju. Spojevi koji su korišteni za tretiranje stanica su: dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, SAD), cisplatina (Cayman Chemical Company, SAD); otopljena u fiziološkoj otopini koncentracije 1666,7 μ M tazemetostat (Cayman Chemical Company, SAD); otopljen u DMSO koncentracije 5mM te GSK-J4 (Sigma-Aldrich, SAD) otopljen u DMSO koncentracije 5 mM.

Skupina	Uvjet	1.dan (0-24 h)	2. dan (24-48h)	3. dan (48-72 h)	5. dan (96h)
1	Kontrolni	Nasađivanje			Izdvajanje proteina
2	DMSO		DMSO		
3	Tazemetostat		Tazemetostat		
4	GSK-J4		GSK-J4		
5	Cisplatina			Cisplatina	
6	Cisplatina + DMSO		DMSO	Cisplatina	
7	Cisplatina + tazemetostat		Tazemetostat	Cisplatina	
8	Cisplatina + GSK-J4		GSK-J4	Cisplatina	

Tablica 3. Vremenski raspored eksperimentalnih tretmana stanica staničnih linija HT 29, Detroit 562 i FaDu.

Tretman cisplatine i tazemetostata je sve stanične linije bio jednak, tako da se cisplatina primjenjivala u koncentraciji od 3 μM , a tazemetostat u koncentraciji od 10 μM . U prijašnjim eksperimentima najotpornijim na spoj GSK-J4 su se pokazale stanice HT-29, Detroit 562 pokazao se umjereno osjetljivim, dok su FaDu stanice najosjetljivije na djelovanje GSK-J4. Zbog tog razloga za potrebe ovog istraživanja korištene su individualne koncentracije GSK-J4 za pojedine linije stanica. Za Detroit 562 – 1 μM ; za FaDu – 0,5 μM ; za HT 29 – 2,5 μM . Svi uzorci su bili nasađeni u 100 μL medija. Za prvi tretman (24-48h nakon nasađivanja) za skupine 2-4 dodano je 100 μL medija sa potrebnom koncentracijom spoja od interesa, dok je za skupine 6-8 prvi tretman bio u 50 μL medija te je prilikom dodatka cisplatine 3. dan (48-72h) dodano još 50 μL medija sa potrebnom koncentracijom cisplatine. Za skupinu 5 cisplatina je samo dodana 3. dan u 100 μL medija.

Statistička obrada podataka

Eksperimenti su rađeni u biološkom duplikatu. Podaci su statistički obrađeni u programu GraphPad Prism 8 i MS Excel. Slike su obrađene u programu ImageJ kao semikvantitativni način provjere razlike količine ekspresije pojedinih proteina između uzoraka. Dobiveni signali su potom analizirani jednosmjernim ANOVA testom i post hoc Tukey testom.

4. Rezultati

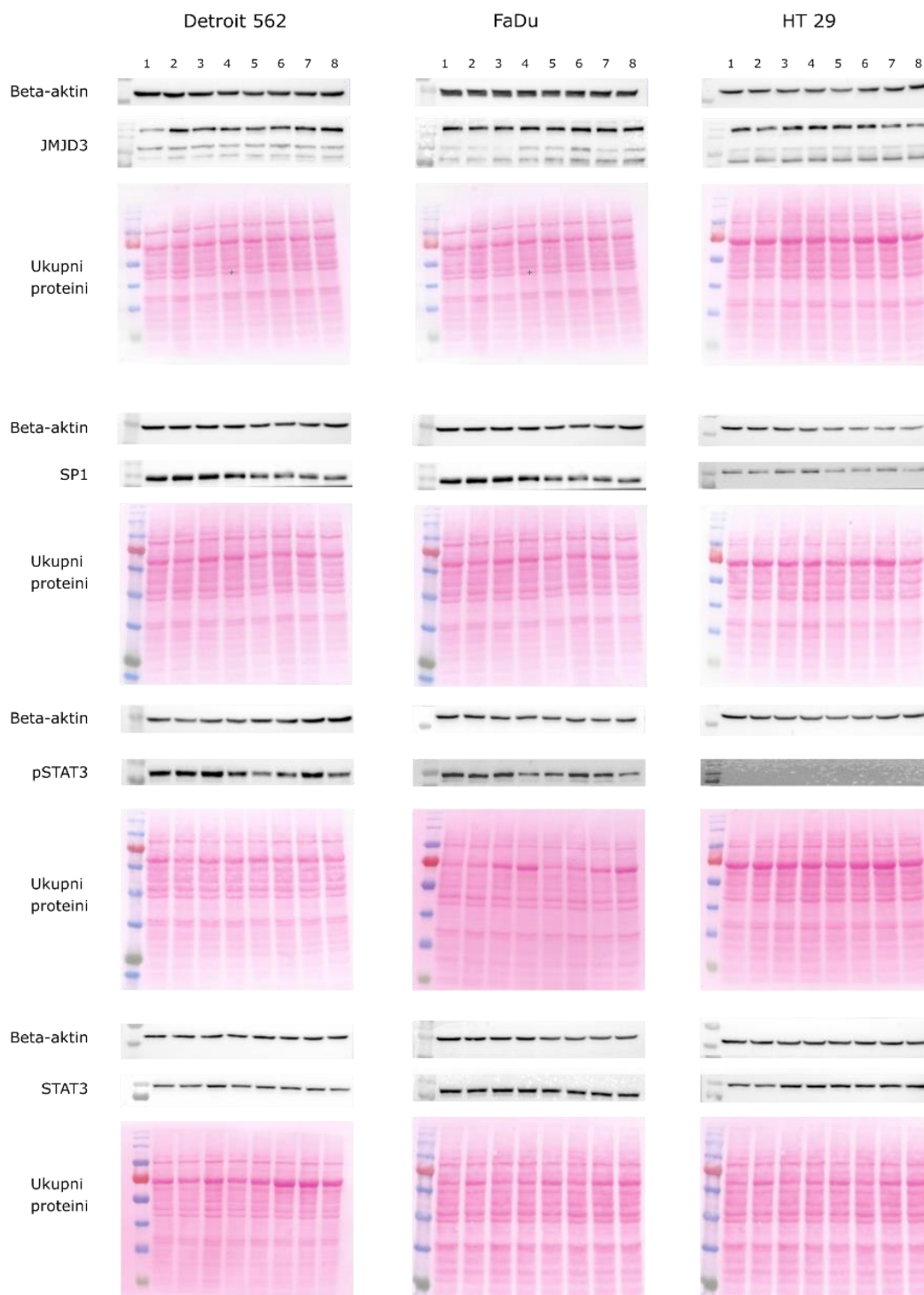
4.1 Western blot

Nakon potvrde uspješnog izdvajanja proteina iz sve tri frakcije: ukupne, nuklearne i citoplazmatske, dobiveni uzorci su korišteni provođenja pokusa Western blot za 4 proteina od interesa: STAT3, pSTAT3, JMJD3 i SP1. Rezultati za svaki su objedinjeni na slikama X-X+3, za svaku od tri stanične linije kako bi se promatrao odgovor pojedinih staničnih linija na razne tretmane. Tretmani su uvijek nanošeni istim redoslijedom:

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

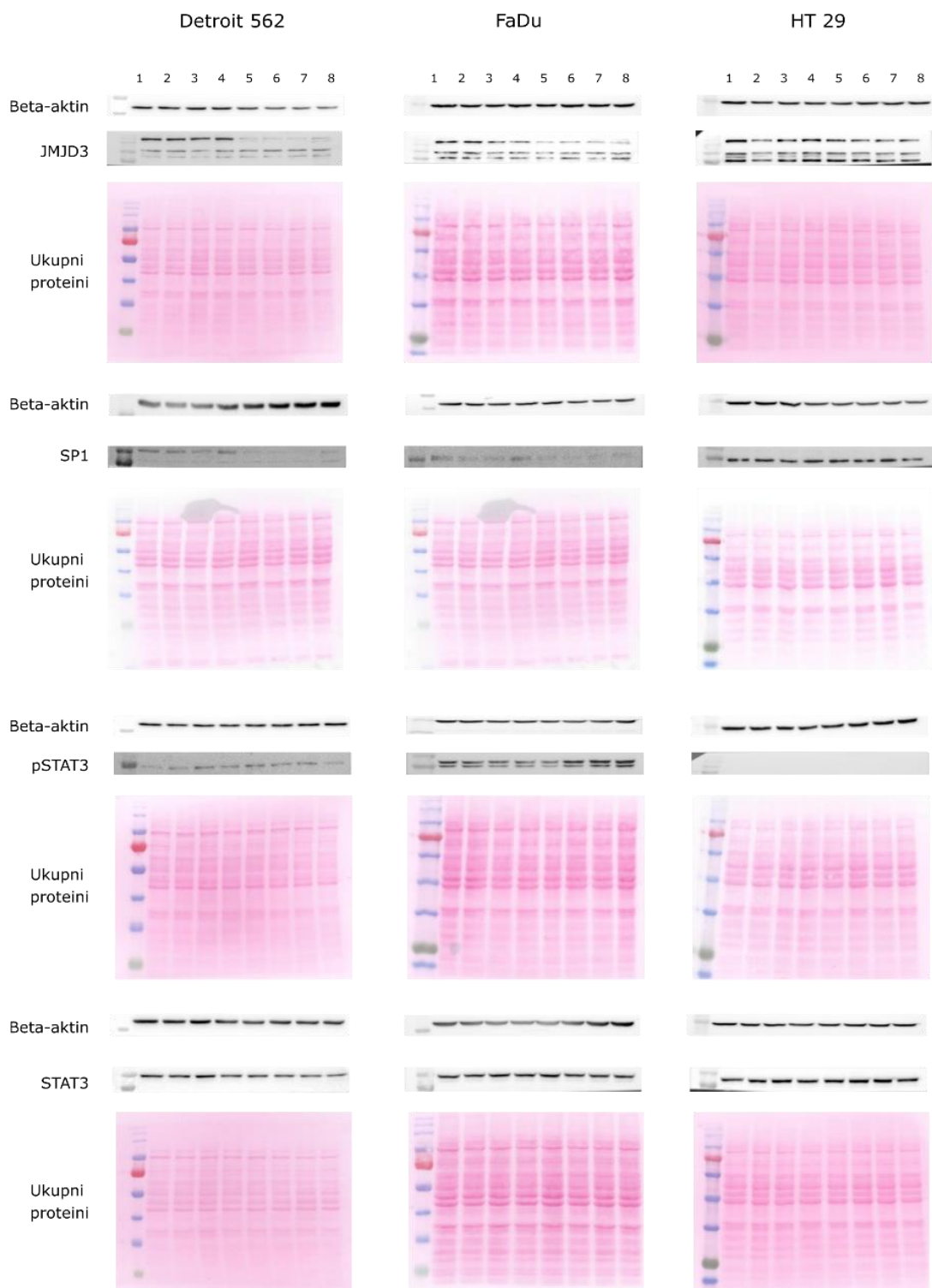
Za svaki uzorak stanica odnosno Western blot u kojem je korišteno protutijelu za određeni protein kao kontrola korišten je specifični gen kućepazitelj, u slučaju ukupnih i citoplazmatskih to je bio beta-aktin a u slučaju nuklearnih to je bio TBP koji je specifičan za jezgru de se ne pronalazi u citoplazmi u značajnim količinama. Kao potvrda uspješnog izdvajanja proteina u svakom uzorku, svi proteini su obojani bojom Ponceu S, te su rezultati obojenja također prikazani ispod svakog uzorka. S obzirom kako su rađeni duplikati za sve uzorke, u slikama Western blota za svaki eksperiment je prikazan samo jedan replikat.

Ukupni proteini



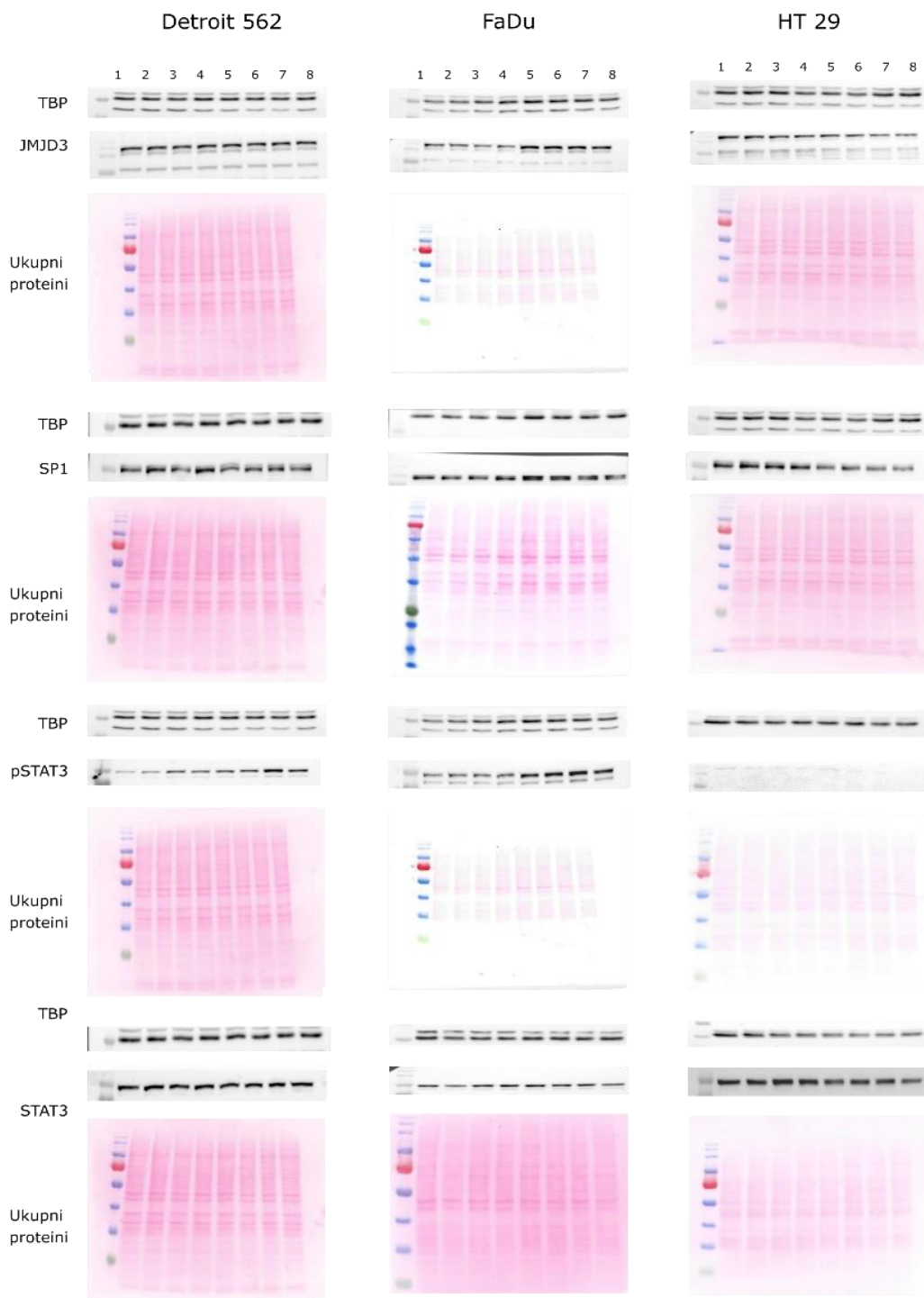
Slika 6. Rezultati Western blot-a za izdvajanje ukupnih proteina uzoraka iz tri stanične linije i četiri proteina od interese-a. Uzorci po jažicama su 1-Kontrola, 2-DMSO, 3-Tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-Cisplatina, 6-Cisplatina i DMSO, 7-Cisplatina i TZM, 8-Cisplatina i GSK-J4.

Citoplazmatski proteini



Slika 7. Rezultati Western blot-a za izdvajanje citoplazmatskih proteina uzoraka iz tri stanične linije i četiri proteina od interesa. Uzorci po jažicama su 1-kontrola, 2-DMSO, 3-tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-cisplatina, 6-cisplatina i DMSO, 7-cisplatina i TZM, 8-cisplatina i GSK-J4.

Nuklearni proteini



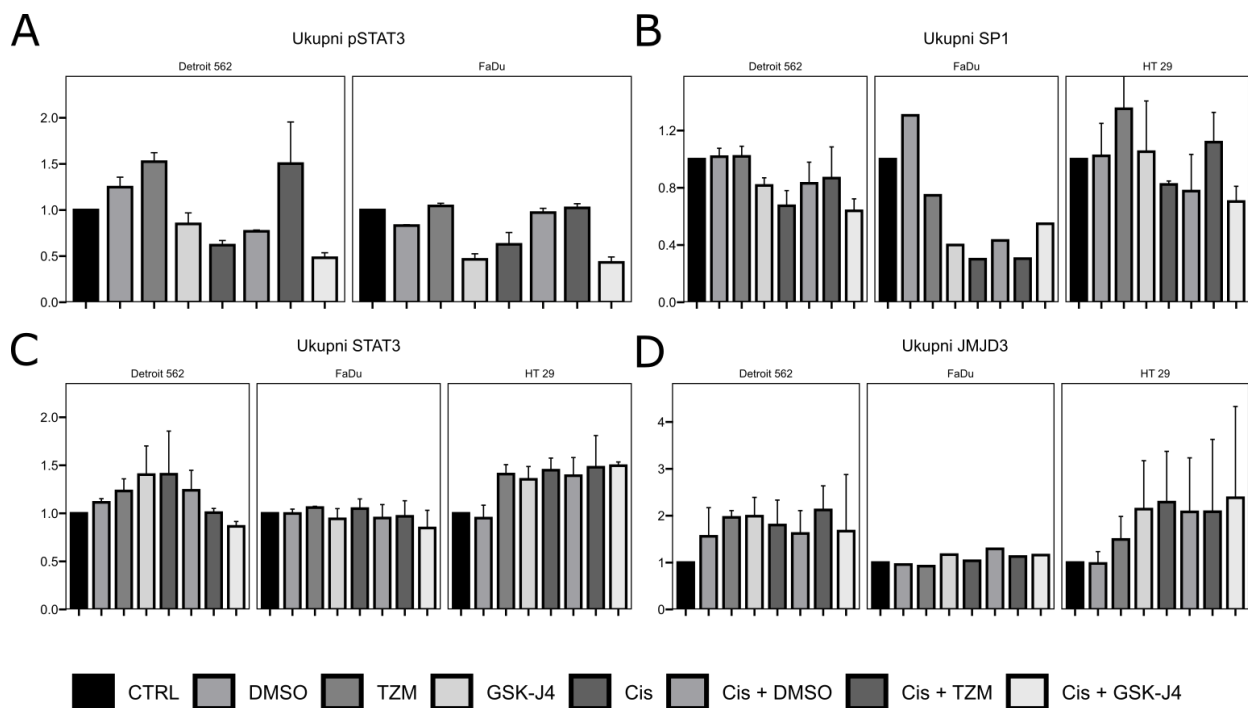
Slika 8. Rezultati Western blot-a za izdvajanje ukupnih proteina uzoraka iz tri stanične linije i četiri proteina od interesa. Uzorci po jažicama su 1-Kontrola, 2-DMSO, 3-Tazemetostat, 4-GSK-J4, 5-Cisplatina, 6-Cisplatina i DMSO, 7-Cisplatina i TzM, 8-Cisplatina i GSK-J4. Za stanice HT 29 niti jedan uzorak nije imao pozitivne rezultate za pSTAT3.

4.2 Kvantifikacija izraženosti proteina

Za statističke analize ispoljenosti proteina određeni denzitometrijom putem programa ImageJ JMJD3, STAT3, pSTAT3 i SP1 uzorci su podijeljeni po 1) Proteinima 2) Mjestu izdvajanja proteina, pa se tako proučava sveukupno 12 mogućih kombinacija. Ako postoje replikati u grafičkim prikazima su prikazane i linije standardne greške, a ako izostaje prisustvo bilo kakvih pozitivnih uzoraka Western blot-a na dvije od 3 stanične linije u za određeni protein od interesa, uzorak nije prikazan. Jačina signala određena je denzitometrijom i normalizirana u odnosu na ukupne proteine i/ili protein housekeeper.

Ukupni proteini

Prvi analizirani uzorci su bili oni iz izoliranih ukupnih proteina iz tri stanične linije prikazani na slici ispod.



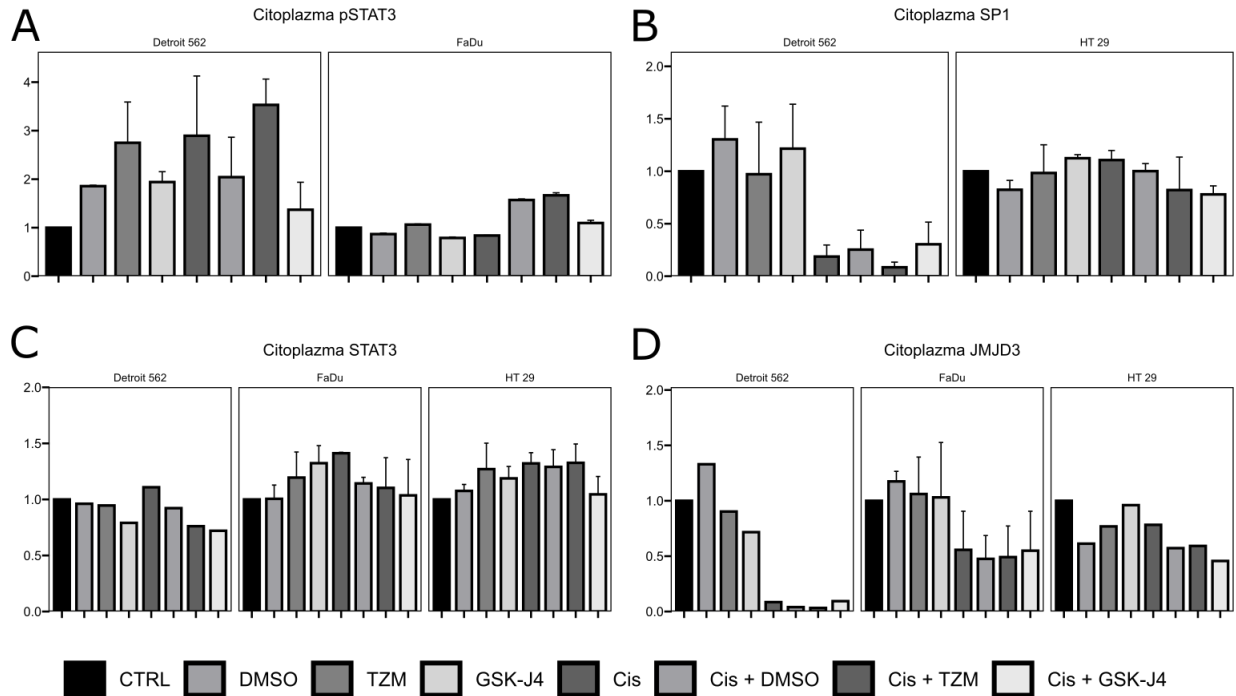
Slika 9. Grafički prikaz rezultata za ukupne stanične proteine. Tretmani su poredani kao u navedenoj tablici te su također prikazani na legendi. Crte označavaju standardnu grešku gdje je postojalo više od 1 replikata sa pozitivnim signalom ciljanog proteina po uzorku. A. Grafički prikaz za pSTAT3 protein, nije imao pozitivne rezultate za nijedan uzorak HT 29 stanica B. Grafički pri-

kaz za SP1 proteina C. Grafički prikaz za STAT3 protein, svi uzorci prisutni D. Grafički prikaz za JMJD3 protein, svi uzorci prisutni.

Vidljivo je da su najznačajnije promjene u ekspresiji proteina uočene su prilikom usporedbe ispoljenosti JMJD3 proteina u stanicama HT 29 i Detroit 562 u slučaju tretmana tazemetostatom, GSK-J4, cisplatina, cisplatina i tazemetostat te cisplatina i GSK-J4, dok u FaDu stanicama nije primijećen sličan učinak ni za jedan od tretmana. Nadalje, primjetan je pad u ekspresiji proteina SP1 u stanicama FaDu i Detroit 562 u tretmanima tazemetostatom i svim tretmanima koji su uključivali cisplatinu. Analizom ekspresije pSTAT3 proteina uočljiva je smanjena ispoljenost nakon tretmana ili samo s GSK-J4 ili kombiniranom tretmanu cisplatinom i GSK-J4, sa najnižim razinama upravo u uzorku tretmana s GSK-J4 i cisplatinom. STAT3 protein je imao najveću razliku u ispoljenosti u slučaju primjene samo cisplatine i u slučaju primjene samo GSK-J4.

Citoplazmatski proteini

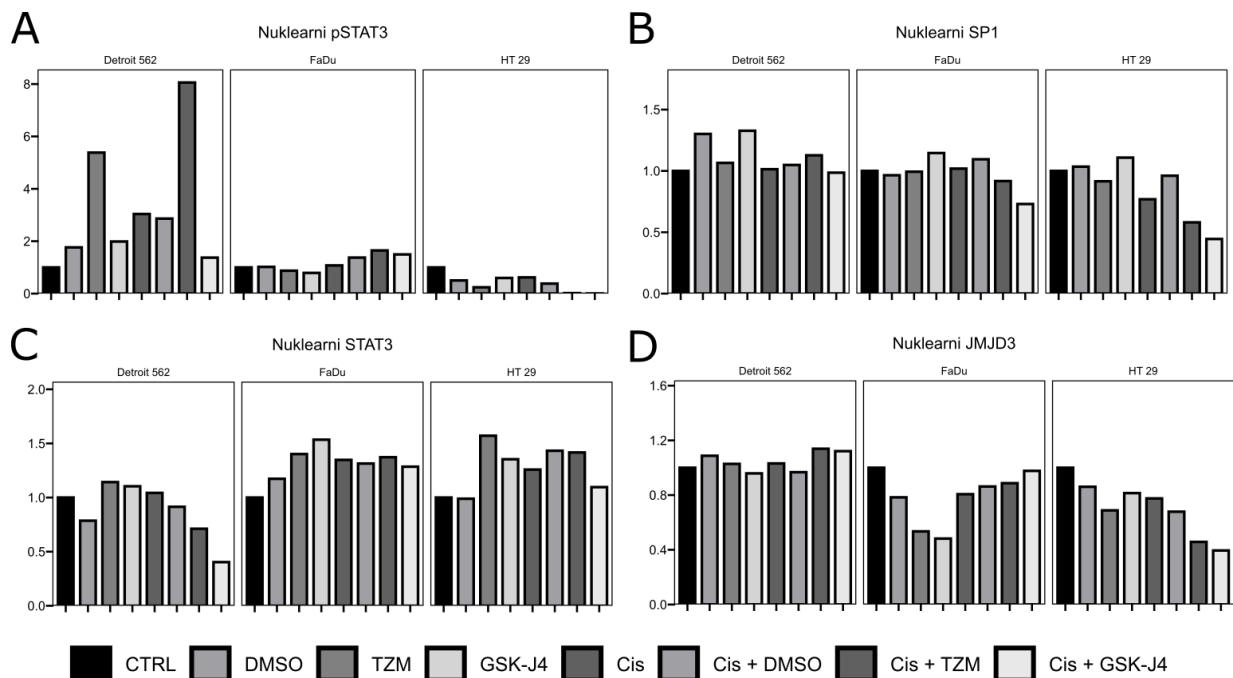
Druga skupina denzitometrijskih analiza je bila nad Western blotovima proteina od interesa izoliranih iz citoplazme. Najizraženiji učinak je vidljiv u uzorcima za SP1 i JMJD3 proteine u Detroit 562 stanicama, gdje je vidljivo da u svim tretmanima gdje je bila uključena cisplatina (5-8) je došlo do izraženog pada u ekspresiji ta dva proteina, dok je sličan efekt isto vidljiv u FaDu stanicama za uzorak JMJD3, no izostaju rezultati za tu staničnu liniju za SP1 proteine. Dodatak samo tazemetostata i GSK-J4 spoja u tim uzorcima je imao relativno slab ili čak suprotni učinak, kao i svi tretmani u slučaju HT 29 stanica. Izraženi učinak se također vidi u uzorku pSTAT3 za Detroit 562 stanice.



Slika 10. Grafički prikaz rezultata za citoplazmatske stanične proteine. Tretmani su poredani kao u navedenoj tablici te su također prikazani na legendi. Crte označavaju standardnu grešku gdje je postojalo više od 1 replikata sa pozitivnim signalom ciljanog proteina po uzorku. A. Grafički prikaz za pSTAT3, uzorak za stanice HT 29 nije imao pozitivne uzorke B. Grafički prikaz za SP1 protein, svi uzorci prisutni C. Grafički prikaz za STAT3 protein, svi uzorci prisutni D. Grafički prikaz za JMJD3 protein, svi uzorci prisutni.

Nuklearni proteini

Konačno, denzitometrijom su analizirani proteini izolirani iz jezgara triju staničnih linija podvrgnuti tretmanima. Svi uzorci su napravljeni u samo jednom replikatu. Rezultati analize su prikazani na slici 6.



Slika 11. Grafički prikaz rezultata za nuklearne stanične proteine. Tretmani su poredani kao u navedenoj tablici te su također prikazani na legendi. A. Grafički prikaz za pSTAT3, svi uzorci prisutni B. Grafički prikaz za SP1 protein, svi uzorci prisutni C. Grafički prikaz za STAT3 protein, svi uzorci prisutni D. Grafički prikaz za JMJD3 protein, svi uzorci prisutni.

Najizrazitiji učinak je vidljiv u ekspresiji pSTAT3 u Detroit 562 stanicama u slučaju tretmana tazemetostatom (5.5 puta povećana ekspresija) i tazemetostatom u kombinaciji s cisplatinom (gotovo 8 puta povećana razina ekspresije). Zanimljivo, količina nefosforiliranog STAT3 proteina je ostala relativno nepromijenjena u uzorcima u kojima je primijećeno povećanje pSTAT3, a smanjena samo u uzorku kombinirane cisplatine i GSK-J4. Također je vidljivo da u slučaju HT 29 stanica učinak je suprotan, te je količina ekspresije pSTAT3 proteina snižena u gotovo svim tretmanima, dok gotovo izostaje u slučajevima cisplatina + tazemetostat i cisplatina + GSK-J4. Razina proteina SP1 je u sva tri uzorka stanica ostala poprilično stabilna osim u slučaju cisplatina + GSK-J4 gdje je za HT 29 stanice gotovo prepolovljena. Količina JMJD3 proteina je također bila stabilna za sve uzorke u Detroit 562 staničnim linijama, blagi pad je uočljiv u slučaju tretmana tazemetostatata i GSK-J4 u stanicama FaDu dok je u HT 29 stanicama količina JMJD3 proteina gotovo prepolovljena u slučaju tretmana cisplatinom + GSK-J4.

4.3 Statistička analiza rezultata denzitometrije

Statistički značajni rezultati za usporedbe testnih skupina sa kontrolnim skupinama izvršeni A-NOVA post-hoc Tukey testovima za sve skupine izdvojenih proteina odnosno denzitometrijske analize rezultata Western blota prikazane su danim tablicama. S obzirom na mali broj replikata te zbog pretpostavki ANOVA testa nije bilo moguće uspoređivati unutar razine ispoljenosti proteina unutar jedne stanične linije, te su dani rezultati za sve 3 stanične linije, odnosno proučavaju se statistički značajne promjene prisutne u svim linijama.

Ukupni proteini				
Protein	Usporedba		Razlika	p-vrijednost
JMJD3	CTRL	Cis	0.83006	0.00430
JMJD3	CTRL	Cis + DMSO	0.82122	0.00488
JMJD3	CTRL	Cis + GSKJ4	0.7092	0.02250
JMJD3	CTRL	Cis + TZM	0.90915	0.00135
JMJD3	CTRL	GSKJ4	0.861536	0.00273
JMJD3	DMSO	Cis + TZM	0.72019	0.01950
JMJD3	DMSO	GSKJ4	0.672573	0.03587
pSTAT3	CTRL	Cis + GSKJ4	-0.54293	0.00756
pSTAT3	DMSO	Cis + GSKJ4	-0.58255	0.00366
SP1	CTRL	Cis	-0.27526	0.00994
SP1	CTRL	Cis + GSKJ4	-0.28447	0.00696
SP1	DMSO	Cis	-0.344	0.00060
SP1	DMSO	Cis + DMSO	-0.29278	0.00501
SP1	DMSO	Cis + GSKJ4	-0.35322	0.00041

Tablica 4. Statistički značajne razlike između različitih tretmana na uzorku ukupnih proteina na podacima dobivenim denzitometrijom. Stupac „Usporedba“ predstavlja par tretmana koji su prepoznati kao statistički značajni. Stupac „Razlika“ predstavlja izračunatu razliku srednjih vrijednosti između tretmana.

Za protein JMJD3 je vidljivo da su svi tretmani u kojima je dodana cisplatinu statistički značajno različiti od uzoraka kontrole, gdje pozitivna razlika prepoznata Tukey testom upućuje na to da je prosječna vrijednost veća 70-90% u odnosu na kontrolne vrijednosti, što upućuje na povećanu ispoljenost proteina JMJD3 posred djelovanja cisplatinu. Dodatno vidljivo je da je čak i dodatak

samog GSK-J4 uzrokovao statistički značajno povećanje u razinama JMJD3 proteina u tri stanične linije. Kada se promatraju usporedbe sa DMSO kontrolnom skupinom, jedina dva statistički značajna tretmana su GSK-J4 i cisplatina + tazemetostat. Protein STAT3 nije imao značajnih razlika u usporedbi sa kontrolnim skupinama. Protein pSTAT3 je jedine značajne razlike imao u slučaju kombiniranog tretmana cisplatine i GSK-J4 i za DMSO i za običnu kontrolu, što upućuje na sinergistički učinak takvog tretmana na promjenu ispoljenosti pSTAT3 proteina. Kod SP1 proteina dodatak same cisplatine je imaju negativan utjecaj na razinu ispoljenosti SP1 proteina, no vidljivo je da uz dodatak GSK-J4 ta razlika postaje još veća, u običnoj kontroli -0.27526 za samu cisplatinu dok je uz dodatak GSK-J4 razlika -0.28447, u slučaju DMSO razlika za cisplatinu je -0.29278 dok uz dodatak GSK-J4 ta razlika raste na -0.35322.

Citoplazmatski				
Protein	Usporedba		Razlika	p-vrijednost
JMJD3	CTRL	Cis	-0.52500	0.00794
JMJD3	CTRL	Cis + DMSO	-0.63747	0.00068
JMJD3	CTRL	Cis + GSKJ4	-0.63349	0.00074
JMJD3	CTRL	Cis + TZM	-0.62805	0.00084
JMJD3	DMSO	Cis	-0.56406	0.00346
JMJD3	DMSO	Cis + DMSO	-0.67653	0.00028
JMJD3	DMSO	Cis + GSKJ4	-0.67255	0.00030
JMJD3	DMSO	Cis + TZM	-0.66711	0.00034

Tablica 5. Statistički značajne razlike između različitih tretmana na uzorku citoplazmatskih proteina na podacima dobivenim denzitometrijom. Stupac „Usporedba“ predstavlja par tretmana koji su prepoznati kao statistički značajni. Stupac „Razlika“ predstavlja izračunatu razliku srednjih vrijednosti između tretmana.

Za rezultate denzitometrijske analize jedine statističke značajne razlike su vidljive samo za JMJD3 protein, i to za sve tretmane u kojima je uključena cisplatina, no i ovdje je vidljiv sinergistički utjecaj na smanjenje ispoljenosti u slučaju kombiniranog tretmana cisplatine i GSK-J4 gdje je tako razlika za kontrolu -0.525, što predstavlja skoro prepolovljenu razinu ispoljenosti, dok je u slučaju dodatka ili GSK-J4 ili tazemetosata razlika povećana na -0.63349 odnosno -0.62805. Sličan obrazac se može primijetiti kod usporedbe sa DMSO kontrolom, gdje je razlika povećana sa -0.56 na -0.67255 u slučaju dodatka GSK-J4 te -0.66711 u slučaju dodatka tazemetostata.

Nuklearni				
Protein	Usporedba		Razlika	p-vrijednost
SP1	CTRL	Cis + GSKJ4	-0.27968	0.00299
SP1	DMSO	Cis + GSKJ4	-0.37990	0.00002
SP1	DMSO	Cis + TZM	-0.22523	0.03298
STAT3	CTRL	TZM	0.37171	0.03000
STAT3	DMSO	TZM	0.38894	0.01943

Tablica 6. Statistički značajne razlike između različitih tretmana na uzorku nuklearnih proteina na podacima dobivenim denzitometrijom. Stupac „Usporedba“ predstavlja par tretmana koji su prepoznati kao statistički značajni. Stupac „Razlika“ predstavlja izračunatu razliku srednjih vrijednosti između tretmana.

Za rezultate analize u slučaju nuklearnih proteina je najmanje statističkih značajnih rezultata, a razlog tomu je najvjerojatniji jer su za nuklearne proteine uzorci odnosno Western blot analize rađene samo u jednom replikatu što uzrokuje manju statističku pouzdanost u primijećene razlike u srednjim vrijednostima. Tako su jedini tretmani sa razlikama između kontrolnim skupinama za protein SP1 cisplatina uz dodatak GSK-J4 i u običnoj i u DMSO kontroli, sa relativno malim razlikama u ispoljenosti (0.27968 i 0.32990) te cisplatina i tazemetostat no samo u slučaju DMSO kontrole. Protein STAT3 jedine statistički značajne rezultate imao za slučaj tretmana tazemetostatom.

5. Rasprava

Glavni cilj ovog istraživanja je bio dokazivanje utjecaja spoja inhibitora metiltransferaze EZH2, tazemetostata, te inhibitora demetilaze JMJD3, GSK-J4 na promjene u ispoljavanju važnih staničnih proteina uključujući i sami JMJD3. Ti spojevi zbog svog karakteristično suprotnog djelovanja u stanicama mogu utjecati na široki spektar signalnih puteva putem aktivacije ili utišavanja aktivnosti gena te posljedično ispoljenosti transkripcijskih faktora te zbog toga predstavljaju bitan predmet istraživanja u kontekstu epigenomike raka. Ovo istraživanje je bilo koncentrirano na istraživanje molekularno bioloških promjena kakve tretman tim spojevima kao i kombinirani tretman cisplatinom može uzrokovati u različitim staničnim linijama glave i vrata te debelog crijeva u proteinima izoliranih iz jezgre, citoplazme te ukupnog staničnih proteina.

Proteinska frakcija sa najvećim brojem statistički značajnih razlika između različitih tretmana je bila ona ukupnih proteina. Proučavanjem rezultata predstavljenima u tablici 3. vidljivo je tretman spojem GSK-J4 uzrokovao značajno povećanje razine ispoljenosti JMJD3 proteina od 86% u usporedbi s običnom kontrolom te 67% u usporedbi sa DMSO kontrolom. Razlog za to može biti prirodni odgovor stanica na tretman inhibitorom, poslije kojeg stanice reagiraju tako da povećaju endogenu proizvodnju ciljnog proteina kako bi negirale utjecaj inhibitora na normalni metabolizam i aktivaciju gena unutar stanice. U istoj usporednoj skupini ukupnih proteina moguće je primijetiti da je dodavanje cisplatine u kombinaciji sa svim ostalim tretmanima uzrokovalo povećanje ispoljenosti JMJD3 proteina, što je u skladu s pokusima koji su dokazali slični fenomen kod stanica osteosarkoma [43] zbog sudjelovanja JMJD3 u brojnim signalnim putevima povezanim sa staničnim odgovorom na izlaganje tako potentnom citostatiku poput RAF/EPK/MAPK kaskade. Nadalje, u istoj frakciji značajno smanjenje pSTAT3 proteina je jedino primijećeno u slučaju kombiniranog tretmana cisplatine i GSK-J4 s najvećim efektom kod Detroit 562 stanica gdje je pad ekspresija čak 60% u odnosu na netretirane kontrole. Takav pad je također zabilježen u literaturi gdje je dokazano da je upravo STAT3 protein jedan od važnijih u staničnom odgovoru na stvaranje rezistencija na cisplatinu, a značajno smanjenje pSTAT3 bez značajnih promjena u STAT3 u uvjetima kombinirane primjene cisplatine i GSK-J4 može implicirati smanjenje staničnog kapaciteta na stvaranje rezistencije na cisplatinu. Zadnji značajni rezultat za frakciju ukupnih proteina je statistički značajno smanjenje ekspresije SP1 proteina u uvjetima

primjene cisplatine, te cisplatine i GSK-J4 gdje je razlika srednjih vrijednosti u usporedbi sa običnom kontrolom blago veća u slučaju kombinirane primjene: 27% cisplatina a 28% cisplatina i GSK-J4, te 34% samo cisplatina a 35% cisplatina i GSK-J4 no te razlike nisu dovoljne kako bi se ustvrdila statistički značajna razlika u kombiniranoj primjeni cisplatine i GSK-J4.

Promatrajući rezultate za proteine izolirane iz citoplazme tih stanice pokazane u tablici 4. vidljivo je da su jedini statistički značajni rezultati oni za protein JMJD3, no rezultati su gotovo jednaki za slučajeve tretmana samo cisplatine i kombinacije cisplatine sa bilo kojim drugim spojevima korištenim u istraživanju što znači da tretman cisplatinom uzrokuje većinu primijećenih razlika u ispoljenosti JMJD3 proteina bez značajnog selektivnog utjecaja GSK-J4 spoja na ispoljenost u citoplazmatskoj frakciji. Pomnim proučavanjem grafičkih prikaza rezultata denzitometrije za izdvajanje citoplazmatskih proteina prikazanih na slici 5. A vidljivo je da su Detroit 562 stanice pokazale također velike razlike za pSTAT3 protein u uvjetima tretmana tazemetostatom, no zbog inertnosti stanica FaDu na isti tretman nije bilo moguće postići razinu statističke značajnosti u te razlike. Uz pSTAT3 Detroit 562 stanice su na slici 5. B pokazale i dosta velike razlike u svim uvjetima koji sadržavaju cisplatinu za SP1 protein u usporedbi sa kontrolom, no ovdje također nije bilo moguće statistički potvrditi rezultate zbog malog broja replikata te relativne stabilne ispoljenosti SP1 proteina u FaDu stanicama u svim tretmanima.

Zadnja skupina rezultata je bila ona na proteinima izoliranih iz jezgara triju staničnih linija. Tu je broj statistički značajnih rezultata bio najmanji, samo 5, uglavnom zbog malog broja staničnih replikata koji su rađeni u Western blotovima. Jedini statistički značajni rezultati su bili oni na STAT3 i SP1 proteinima. U slučaju SP1 proteina vidljivo je iz tablice 5. da značajni rezultati pripadaju samo kombiniranom tretmanu cisplatine i GSK-J4, što je slično rezultatima primijećeni za ukupne stanične proteine, gdje je također kombinirana primjena cisplatine i GSK-J4 polučila najveće razlike između kontrole. Za razlike primijećene za STAT3 protein jedini značajni rezultati su bili za tazemetostat, no te razlike su bili poprilično male, te proučavanjem slike 6. C na kojoj su predstavljeni svi rezultati za nuklearni STAT3 vidljivo je da su svi tretmani u približnoj razini promjene u razini STAT3, što je zapravo i normalno za očekivati s obzirom na to da se STAT3 u jezgri nalazi u jako malim količina te je tu puno važnija njegova fosforilirana varijanta. Stoga je važno primijetiti i rezultate na slici 6. A za Detroit 562 i pSTAT3 protein, gdje je došlo do ogrom-

ne pozitivne promjene u ekspresiji pSTAT3 u slučaju tretmana sa tazemetostatom ali i cisplatinom sa još većom ekspresijom upravo u slučaju kombinirane primjene cisplatine i tazemetostata. S obzirom kako se pSTAT3 varijanta proteina ima izrazito bitnu funkciju upravo u jezgri te aktivira brojne stanične puteve, očito postoji indikacija da kombinirana primjena cisplatine i tazemetostata može uzrokovati promjenu epigenetskog okoliša te posljedično direktno mijenjati ekspresiju važnih transkripcijskih faktora.

6. Zaključak

Zaključno, istraživanje je djelomično ostvarilo svoje ciljeve u analizi utjecaja primjene GSK-J4 i tazemetostata na ispoljenost JMJD3 proteina te ekspresiju SP1 i STAT3 transkripcijskih faktora. Dokazan je djelomičan utjecaj GSK-J4 na ove promjene, iako se većina opaženog učinka može pripisati upotrebi cisplatine u eksperimentima u slučaju proteina citoplazme i ukupnih proteina. Najznačajniji rezultat istraživanja je bila promjena ekspresije pSTAT3 proteina nakon primjene tazemetostata, iako nije postignuta statistička značajnost u tim promjenama. Ovi rezultati sugeriraju da bi daljnja istraživanja trebala bolje razlučiti određene učinke GSK-J4 od utjecaja drugih korištenih spojeva kako bi se jasnije razumjelo njihovo djelovanje na ispoljenost ciljanih proteina i transkripcijskih faktora kao i povećati broj replikata korištenih u istraživanju te broj proučavanih proteina koji bi se nalazili nizvodno u signalnim putevima od transkripcijskih faktora korištenih u ovom istraživanju kako bi se istražio pravi biološki utjecaj na promjenu epigenetskog okoliša stanica raka korištenjem ovih spojeva.

Literatura

- [1] T. Ozaki and A. Nakagawara, "Role of p53 in cell death and human cancers," *Cancers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 994–1013, 2011, doi: 10.3390/cancers3010994.
- [2] D. Li, F. F. Bi, J. M. Cao, C. Cao, C. Y. Li, and Q. Yang, "Effect of BRCA1 on epidermal growth factor receptor in ovarian cancer," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 32, no. 1, pp. 1–6, 2013, doi: 10.1186/1756-9966-32-102.
- [3] D. T. Debela *et al.*, "New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives," *SAGE Open Med.*, vol. 9, 2021, doi: 10.1177/205031212111034366.
- [4] W. M. C. van den Boogaard, D. S. J. Komninos, and W. P. Vermeij, "Chemotherapy Side-Effects: Not All DNA Damage Is Equal," *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 3, pp. 1–27, 2022, doi: 10.3390/cancers14030627.
- [5] S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, "Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 740, pp. 364–378, 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [6] L. Galluzzi *et al.*, "Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future," *Cell Death Dis.*, vol. 5, pp. 1–18, 2014, doi: 10.1038/cddis.2013.428.
- [7] B. Weinhold, "Epigenetics: the science of change.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 114, no. 3, pp. 160–167, 2006, doi: 10.1289/ehp.114-a160.
- [8] A. Farsetti, B. Illi, and C. Gaetano, "How epigenetics impacts on human diseases," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 114, no. May, pp. 15–22, 2023, doi: 10.1016/j.ejim.2023.05.036.
- [9] S. Sharma, T. K. Kelly, and P. A. Jones, "Epigenetics in cancer," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 1, pp. 27–36, 2009, doi: 10.1093/carcin/bgp220.
- [10] L. D. Moore, T. Le, and G. Fan, "DNA methylation and its basic function," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 23–38, 2013, doi: 10.1038/npp.2012.112.
- [11] D. M. Messerschmidt, B. B. Knowles, and D. Solter, "DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos," *Genes Dev.*, vol. 28, no. 8, pp. 812–828, 2014, doi: 10.1101/gad.234294.113.
- [12] A. Nishiyama and M. Nakanishi, "Navigating the DNA methylation landscape of cancer," *Trends Genet.*, vol. 37, no. 11, pp. 1012–1027, 2021, doi: 10.1016/j.tig.2021.05.002.
- [13] J. Liao *et al.*, "Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells," *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 5, pp. 469–478, 2015, doi: 10.1038/ng.3258.
- [14] J. W. Chiang, B. Y. Karlan, Ilana Cass, and R. L. Baldwin, "BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis," *Gynecol. Oncol.*, vol. 101, no. 3, pp. 403–410, 2006, doi: 10.1016/j.ygyno.2005.10.034.

- [15] T. Sakai, J. Toguchida, N. Ohtani, D. W. Yandell, J. M. Rapaport, and T. P. Dryja, "Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 48, no. 5, pp. 880–888, 1991.
- [16] M. Acevedo *et al.*, "A CDK4/6-dependent epigenetic mechanism protects cancer cells from PML-induced senescence," *Cancer Res.*, vol. 76, no. 11, pp. 3252–3264, 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2347.
- [17] M. J. Dabrowski and B. Wojtas, "Global DNA methylation patterns in human gliomas and their interplay with other epigenetic modifications," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 14, 2019, doi: 10.3390/ijms20143478.
- [18] S. K. Patra, "Ras regulation of DNA-methylation and cancer," *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 6, pp. 1193–1201, 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.01.012.
- [19] G. Gopisetty, K. Ramachandran, and R. Singal, "DNA methylation and apoptosis," *Mol. Immunol.*, vol. 43, no. 11, pp. 1729–1740, 2006, doi: 10.1016/j.molimm.2005.11.010.
- [20] T. Kouzarides, "Chromatin Modifications and Their Function," *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 693–705, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- [21] J. Huang *et al.*, "The noncanonical role of EZH2 in cancer," *Cancer Sci.*, vol. 112, no. 4, pp. 1376–1382, 2021, doi: 10.1111/cas.14840.
- [22] H. Wu *et al.*, "Structure of the catalytic domain of EZH2 reveals conformational plasticity in cofactor and substrate binding sites and explains oncogenic mutations," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. 1–12, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0083737.
- [23] C. Hua *et al.*, "KDM6 Demethylases and Their Roles in Human Cancers," *Front. Oncol.*, vol. 11, no. December, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.779918.
- [24] J. M. K. Ng and J. Yu, "Promoter hypermethylation of tumour suppressor genes as potential biomarkers in colorectal cancer," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 2472–2496, 2015, doi: 10.3390/ijms16022472.
- [25] J. Ellinger *et al.*, "Alterations of global histone H3K9 and H3K27 methylation levels in bladder cancer," *Urol. Int.*, vol. 93, no. 1, pp. 113–118, 2014, doi: 10.1159/000355467.
- [26] J. E. Audia and R. M. Campbell, "Histone modifications and cancer," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 8, no. 4, 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a019521.
- [27] K. H. Kim and C. W. M. Roberts, "Targeting EZH2 in cancer," *Nat. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 128–134, 2016, doi: 10.1038/nm.4036.
- [28] J. Chernoff, "The two-hit theory hits 50," *Mol. Biol. Cell*, vol. 32, no. 22, pp. 1–4, 2021, doi: 10.1091/mbc.E21-08-0407.
- [29] D. B. Yap *et al.*, "Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation," *Blood*, vol. 117, no. 8, pp. 2451–2459, 2011, doi: 10.1182/blood-2010-11-321208.

- [30] M. E. McLaughlin-Drubin, C. P. Crum, and K. Münger, "Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 5, pp. 2130–2135, 2011, doi: 10.1073/pnas.1009933108.
- [31] N. Tsuyama *et al.*, "Epstein-Barr virus-negative extranodal 'true' natural killer-cell lymphoma harbouring a KDM6A mutation," *Hematol. Oncol.*, vol. 36, no. 1, pp. 328–335, 2018, doi: 10.1002/hon.2459.
- [32] R. Mathur *et al.*, "Inhibition of demethylase KDM6B sensitizes diffuse large B-cell lymphoma to chemotherapeutic drugs," *Haematologica*, vol. 102, no. 2, pp. 373–380, 2017, doi: 10.3324/haematol.2016.144964.
- [33] M. Yamagishi, D. Fujikawa, T. Watanabe, and K. Uchamaru, "HTLV-1-mediated epigenetic pathway to adult T-cell leukemia-lymphoma," *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. JUL, pp. 1–8, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01686.
- [34] A. Lang *et al.*, "Knockdown of UTX / KDM6A Enriches Precursor Cell," pp. 1–22, 2020.
- [35] R. Straining, PharmD and W. Eighmy, PharmD, "Tazemetostat: EZH2 Inhibitor," *J. Adv. Pract. Oncol.*, vol. 13, no. 2, pp. 158–163, 2022, doi: 10.6004/jadpro.2022.13.2.7.
- [36] E. Julia and G. Salles, "EZH2 inhibition by tazemetostat: Mechanisms of action, safety and efficacy in relapsed/refractory follicular lymphoma," *Futur. Oncol.*, vol. 17, no. 17, pp. 2127–2140, 2021, doi: 10.2217/fon-2020-1244.
- [37] L. Kruidenier *et al.*, "A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response," *Nature*, vol. 488, no. 7411, pp. 404–408, 2012, doi: 10.1038/nature11262.
- [38] L. Li, S. He, J. M. Sun, and J. R. Davie, "Gene regulation by Sp1 and Sp3," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 82, no. 4, pp. 460–471, 2004, doi: 10.1139/o04-045.
- [39] L. O'Connor, J. Gilmour, and C. Bonifer, "The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 89, no. 4, pp. 513–525, 2016.
- [40] M. Kim, L. D. Morales, I. S. Jang, Y. Y. Cho, and D. J. Kim, "Protein tyrosine phosphatases as potential regulators of STAT3 signaling," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 9, pp. 1–19, 2018, doi: 10.3390/ijms19092708.
- [41] Y. Sun *et al.*, "Genome-Wide STAT3 Binding Analysis after Histone Deacetylase Inhibition Reveals Novel Target Genes in Dendritic Cells," *J. Innate Immun.*, vol. 9, no. 2, pp. 126–144, 2017, doi: 10.1159/000450681.
- [42] Y. M. Pan *et al.*, "STAT3 signaling drives EZH2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer," *Mol. Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1186/s12943-016-0561-z.
- [43] C. He, J. Sun, C. Liu, Y. Jiang, and Y. Hao, "Elevated H3K27me3 levels sensitize

osteosarcoma to cisplatin," *Clin. Epigenetics*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1186/s13148-018-0605-x.