Utjecaj puta dojavljivanja „Notch“ na diferencijaciju stanica hematopoeze

Paradžik, Mladen

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:708441

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Mladen Paradžik

UTJECAJ PUTA DOJAVLJIVANJA „NOTCH" NA DIFERENCIJACIJU STANICA HEMATOPOEZE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DIVISION OF BIOLOGY

Mladen Paradžik

THE ROLE OF “NOTCH” SIGNALING IN DIFFERENTIATION OF HEMATOPOIETIC CELLS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

„Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za elektronsku mikroskopiju Zavoda za molekularnu biologiju na Institutu Ruđer Bošković, pod vodstvom prof.dr.sc. Mariastefanie Antice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“.

Zahvale:

Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. Antici, na znanju koje je uspjela prenijeti na mene te joj zahvaljujem što mi je omogućila izradu ove doktorske disertacije.

Zahvalu dugujem i dr. Dušici Vujakliji, na mnoštvu savjeta i izrečenih mudrosti prilikom pisanja doktorata. Usudio bih se reći kako do finalizacije rada ne bi došlo bez njene svesrdne pomoći, na čemu joj iskreno zahvaljujem. Također, veliko hvala i ostatku Laboratorija za molekularnu genetiku, a posebno zahvaljujem Želimiri Filić, koja mi je savjetima uvelike pomogla pri izvedbi nekih pokusa.

Ogromno hvala ide i Laboratoriju za diferencijaciju i fiziologiju limfocita T, na čelu s dr. Sophie Ezine, koja je imala sluha i razumijevanja primiti me te mi savjetima, sredstvima i susretljivošću omogućiti izradu većeg dijela istraživanja u savršeno opremljenom Laboratoriju. Pritom veliku zahvalnost dugujem i tehničarki Agnes Legrand, koja me uvela u svijet multiplex PCR-a i rada na pojedinačnim stanicama, te stručnjaku za protočnu citometriju, Jérômeu Mégretu, od kojeg sam imao priliku učiti. Veliko hvala i ostalim članovima Laboratorija. Također zahvaljujem i članovima Laboratorija za elektronsku mikroskopiju, koji su na bilo koji način pridonijeli da ovaj doktorat ugleda svjetlo dana. Posebna zahvala Josipi Skelin i Josipu Maduniću na pomoći kod nekih pokusa te dr. Maji Matulić na mnogim savjetima i učenju nekih tehnika i metoda.

Zahvaljujem cijelom osoblju KB Merkur, na čelu s dr. Ikom Kardum-Skelin te dr. Biljanom Jelić-Puškarić, bez čijeg rada i strpljivog skupljanja uzoraka ne bi bilo moguće provesti istraživanja sadržana u ovom doktoratu.

Zahvaljujem i članovima Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada, dr. Vesni Benković, dr. Zorani Grubić te dr. Kreši Bendelji, na ukazanoj susretljivosti, detaljnom čitanju disertacije i pruženim savjetima. Na svim pruženim savjetima zahvalnost dugujem i Voditeljici Poslijediplomskog studija biologije, dr. Dunji Leljak-Levanić, koja je imala puno razumijevanja tijekom završnih faza predaje doktorata.

I na kraju veliko hvala obitelji na velikoj podršci kroz život. Posebno hvala i mojoj suprugi Tini bez čije bi potpore dosta stvari bilo nemoguće izvesti, te sinu Antoniju i novorođenoj kćerkici Teni, kojima ujedno i posvećujem ovaj doktorat. Također zahvaljujem i svim prijateljima i kolegama koji su na bilo koji način pridonijeli doktoratu pa maker to bila i najmanja riječ ili savjet.

Sveučilište u Zagrebu
Doktorski rad
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

UTJECAJ PUTA DOJAVLJIVANJA „NOTCH“ NA DIFERENCIJACIJU STANICA HEMATOPOEZE

MLADEN PARADŽIK

Institut Ruđer Bošković

Diferencijacija krvnih stanica iz hematopoetskih stanica matica upravljana je mnoštvom čimbenika, od kojih značajnu ulogu imaju transkripcijski čimbenici iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch. Pokazano je kako su čimbenici iz obitelji Ikaros bitni za normalan razvoj limfoidnih loza te da aberantne promjene u njihovoj ekspresiji mogu dovesti do razvoja limfoma kod miševa. Dojavljivanje putem Notcha ključno je za upravljanje smjera diferencijacije hematopoetskih stanica. Dok je značenje u diferencijaciji limfocita T dobro proučeno, uloga navedenih puteva u diferencijaciji limfocita B te mijeloidnoj lozi ostaje slabo istražena, a rezultati kontradiktorni. Cilj rada je ispitati povezanost navedenih puteva kao i njihovu ulogu u diferencijaciji limfoidne i mijeloidne loze pomoću molekularnih metoda poput višestruke lančane reakcije polimerazom na razini pojedinačne stanice, lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, bugačenja po Westernu te protočne citometrije. Pokazano je kako čimbenici obitelji Ikaros interagiraju s putem dojavljivanja Notch.Također, Notch ima bitnu ulogu pri diferencijaciji mijeloidnih loza stanica te je bitan čimbenik sprečavanja nastanka apoptoze kod osoba oboljelih od kronične leukemije limfocita B.

(112 stranica, 31 slika, 21 tablica, 167 literaturnih navoda, jezik izvornika- hrvatski)

Ključne riječi: (*Notch, Ikaros, diferencijacija, hematopoeza, leukemija)*

Mentor: Dr.sc. *Mariastefania Antica, Izvanredni profesor*

Ocjenjivači: *Dr.sc. Krešo Bendelja, Viši znanstveni suradnik,*

Dr. sc. Vesna Benković, Izvanredni profesor,

Dr. sc. Zorana Grubić, Izvanredni profesor.

University of Zagreb
Doctoral thesis
Faculty of Science
Division of Biology

THE ROLE OF "NOTCH" SIGNALING IN DIFFERENTIATION OF HEMATOPOIETIC CELLS

MLADEN PARADŽIK

Rudjer Boskovic institute

Differentiation of hematopoietic stem cells into functional mature cells is controlled by a wide array of transcriptional regulators. Ikaros family transcription factors and the Notch signaling pathway are important parts of these processes. It was shown that Ikaros members are essential for the lymphoid development and aberrant changes in their expression could lead to lymphoma expansion in mice. Notch signaling also has a key role in directing the hematopoietic cell fate and its role is mainly confirmed in T lymphocyte development. However, the importance of the Notch signaling in the development of B lymphocytes and myeolid lineage remains poorly understood. The aim of this study is to define the correlation of Ikaros and Notch families in the differentiation of the lymphoid and myeloid lineages, using molecular techniques such as single cell multiplex PCR, real time PCR, Western blotting and flow cytometry. It was confirmed that Ikaros family members interact with the members of Notch signaling pathway. Furthermore, Notch plays a key role in myeloid differentiation and it is important factor in the regulation of the apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia.

(112 pages, 31 figures, 21 tables, 167 references, original in Croatian language)

Keywords: *(Notch, Ikaros family, differentiation, hematopoesis, leukemia)*

Supervisor: *Dr.sc. Mariastefania Antica, Associate Professor*

Reviewers: *Dr. sc. Krešo Bendelja, Senior research associate,*
Dr. sc. Vesna Benković, Associate Professor*,*
Dr. sc. Zorana Grubić, Associate Professor.

Kazalo

1 Uvod 1
1.1 Plan istraživanja 3
1.2 Očekivani znanstveni doprinos predloženog istraživanja 3
2 Literaturni pregled 4
2.1 Transkripcijski čimbenici 5
2.2 Razredbovanje transkripcijskih čimbenika 5
2.2.1 Uzvojnica-omča-uzvojnica 6
2.2.2 Leucinski zatvarač 6
2.2.3 Uzvojnica-okret-uzvojnica 7
2.2.4 Domene koje svijaju DNA 8
2.2.5 Transkripcijski čimbenici s motivom cinkovih prstiju 8
2.3 Uloga transkripcijskih čimbenika u hematopoezi 9
2.4 Transkripcijski čimbenici u razvoju limfocita B 10
2.5 Čimbenici i mehanizmi bitni za razvoj stanica mijeloidne loze 12
2.6 Diferencijacija u smjeru mijeloidne loze potaknuta agensom PMA 14
2.7 Put dojavljivanja Notch 14
2.8 Obitelj transkripcijskih čimbenika Ikaros 20
2.9 Proliferativni poremećaji 23
2.10 Obitelj Ikaros i put dojavljivanja Notch u proliferativnim poremećajima 24
3 Ispitanici, materijali i metode 27
3.1 Ispitanici 28
3.2 Materijali 30
3.2.1 Kemikalije 30
3.2.2 Loze stanica 32
3.3 Metode 34
3.3.1 Izdvajanje stanica na gradijentu gustoće 34
3.3.2 Brojanje stanica 34
3.3.3 Zamrzavanje stanica i pohrana 34
3.3.4 Kultura animalnih stanica 34
3.3.5 Protočna citometrija 35
3.3.6 Kokultivacija i diferencijacija 36
3.3.7 Apoptoza 37
3.3.8 Razvrstavanje stanica 37
3.3.9 Mjerenje koncentracije, SDS PAGE, bugačenje po Westernu te imunodetekcija proteina 38
3.3.10 Izdvajanje ukupne RNA 41
3.3.11 Obrnuto prepisivanje enzimom Superscript III 41
3.3.12 Lančana reakcija polimerazom 42
3.3.13 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Taqman metoda) 42
3.3.14 Višestruko umnažanje lančanom reakcijom polimerazom 45
3.3.15 Statistička analiza 52
4 Rezultati 53
4.1 Kinetika ekspresije gena iz obitelji Ikaros i Notch tijekom diferencijacije hematopetskih stanica 54

4.2 Postupak dokazivanja ekspresije Notch1 kod osoba oboljelih od B-CLL 57
4.3 Utjecaj puta dojavljivanja Notch na spontanu pojavu apoptoze tijekom zajedničkog uzgoja sa stanicama OP9-DL1 59
4.4 Razvrstavanje stanica 62
4.5 Analiza višegenske koekspresije na razini pojedinačnih stanica; povezanost puta dojavljivanja Notch te transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros 65
4.6 Mjerenje apsolutnog broja kopija molekula glasničke RNA Notch1 u stanicama zdravih ispitanika te kod stanica zloćudnog klona B-CLL 69
5 Rasprava 73
6 Zaključak 81
7 Popis literature 84
8 Prilog A 99
8.1 Utjecaj puta dojavljivanja Notch na diferencijaciju stanica hematopoeze ... 100
8.1.1 Detekcija reaktivnih kisikovih radikala 100
8.1.2 Konfokalna mikroskopija 100
8.1.3 Rezultati 101
8.2 Učinak aktivacije puta dojavljivanja Notch na proliferaciju hematopoetskih stanica…… 105
8.2.1 Test proliferacije stanica WST-1 105
8.2.2 Rezultati 105
9 Prilog B 107
9.1 Popis kratica 108
10 Životopis 111

1 Uvod

Stvaranje te diferencijacija funkcionalnih krvnih stanica iz hematopoetskih stanica matica upravljani su mnoštvom čimbenika, od kojih značajnu ulogu imaju transkripcijski čimbenici iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch. Pokazano je da su čimbenici iz obitelji Ikaros bitni za normalan razvoj limfoidnih loza te kako aberantne promjene u njihovoj ekspresiji mogu dovesti do razvoja limfoma kod miševa (1). Receptori puta dojavljivanja Notch transmembranski su proteini koji igraju značajnu ulogu prilikom međudjelovanja sa susjednim stanicama i bitni su pri procesima proliferacije, apoptoze te diferencijacije stanica. Mnoga dosadašnja istraživanja potvrdila su kako je dojavljivanje putem Notcha ključan korak pri upravljanju smjera diferencijacije hematopoetskih stanica te su istraživanja gubitka funkcije gena za Notch pokazala njegovu odlučujuću ulogu u razvoju različitih zloćudnih hematoloških novotvorina (2). Dok je uloga pri diferencijaciji limfocita T dobro proučena, ponajviše zahvaljujući otkriću povezanosti mutacija gena za Notch s pojavom i razvojem akutne leukemije limfocita T, značenje navedenih puteva u diferencijaciji limfocita B te mijeloidnoj lozi ostaje slabo istraženo, a rezultati kontradiktorni. Jedna od uloga Notcha otkrivena je u kroničnoj leukemiji limfocita B, gdje je pokazano kako Notch utječe na sprečavanje nastanka apoptoze unutar zloćudnog klona, čuvajući na taj način moguće uklanjanje te omogućujući nakupljanje zloćudnih stanica u koštanoj srži (3, 4). Kannan i sur. pokazali su da put dojavljivanja Notch inhibira rast i preživljenje stanica akutne mijeloidne leukemije, dok su Lobry i sur. uvidjeli da aktivacija puta dojavljivanja Notch utječe na diferencijaciju i homeostazu stanica akutne mijeloidne leukemije (5, 6). Utjecaj međudjelovanja čimbenika iz obitelji Ikaros te Notch iznimno je slabo istražen te je svrha doktorske disertacije pokušati ispitati povezanost navedenih puteva kao i njihovu ulogu u diferencijaciji limfoidne i mijeloidne loze. Cilj ove doktorske disertacije je propitati i donekle rasvijetliti ulogu puta dojavljivanja Notch pri diferencijaciji hematopoetskih stanica na modelima dvaju najčešćih leukemija ljudi u odrasloj dobi, kronične leukemije limfocita B te akutne mijeloidne leukemije. Također, jedan od glavnih ciljeva je i praćenje koekspresije i međudjelovanje gena za transkripcijske čimbenike iz obitelji Ikaros i puta dojavljivanja Notch na populacijskoj te razini pojedinačne stanice.

.

1.1 Plan istraživanja

Istraživanja o utjecaju aktivacije Notcha pratit ćemo testom proliferacije, ispitivanjem stupnja apoptoze te funkcionalnim testom djelovanja na diferencijaciju leukemijskih stanica.

Ekspresiju transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch na razini prepisivanja glasničke mRNA ispitivat ćemo lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu. Ekspresiju proteina prikazat ćemo i provjeriti metodama bugačenja po Westernu te protočnom citometrijom.

Istraživat ćemo ciljne gene na razini glasničke RNA pojedinačnih stanica osoba oboljelih od B-CLL metodom istovremene višestruke lančane reakcije polimerazom. S obzirom na ključne uloge transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch u hematopoezi, a istodobno na izostanak podataka o njihovom međudjelovanju, pratit ćemo i koekspresiju navedenih članova. Također, odredit će se i ukupni broj molekula glasničke RNA za Notch1 po pojedinačnoj stanici.

1.2 Očekivani znanstveni doprinos predloženog istraživanja

Pojašnjavanje mehanizama bitnih za razvoj hematopoetskih stanica te uloga interakcije transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros i puta dojavljivanja Notch od ključnog su značenja za daljnje usavršavanje prognostičko-dijagnostičkih metoda, kao i samu farmakološku primjenu znanja u liječenju zloćudnih bolesti nastalih remećenjem i krivim usmjeravanjem diferencijacije stanica.

2 Literaturni pregled

2.1 Transkripcijski čimbenici

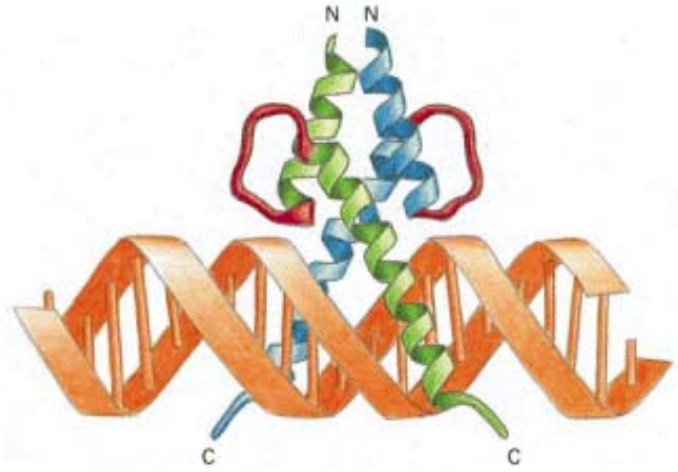
Transkripcijski čimbenici su proteini sa sposobnošću vezanja posebnih sljedova u molekulama DNA-genoma čime utječu na regulaciju ekspresije gena, kroz novačenje ili utišavanje aktivnosti enzima RNA-polimeraze II (7, 8). Osim samog vezanja za DNA, transkripcijski čimbenici imaju sposobnost vezanja drugih proteina pri čemu može doći do tvorenja većih kompleksa koji reguliraju aktivnost transkripcijskih čimbenika. Većina transkripcijskih čimbenika sastoji se od dvije domene: aktivacijske te domene koja veže DNA. Domena koja veže DNA sastoji se od aminokiselina koje će se vezati na molekulu DNA ukoliko prepoznaju mjesto početka prepisivanja, dok će aminokiseline u aktivacijskoj domeni vezati RNA-polimerazu II i druge regulacijske proteine, sudjelujući na taj način u transkripciji. S obzirom na prepoznavanje točno određenih sljedova nukleotida, transkripcijski čimbenici imaju mogućnost ograničenog vezanja na posebna mjesta unutar molekule DNA. Obično se međudjelovanje transkripcijskog čimbenika te dvolančane uzvojnice DNA ostvari nekovalentnim vezanjem jednog dijela proteina s DNA na mjestu velikog ili malog utora (9). U velikom utoru bočni ogranci aminokiselina transkripcijskog čimbenika tvore vodikove veze s bazama, dok u malom utoru nastaju prvenstveno hidrofobne interakcije. Što se tiče površine dvolančane uzvojnice, najčešće su elektrostatske veze izazvane privlačenjem suprotno nabijenih fosfatnih ostataka i pozitivno nabijenih bočnih ogranaka aminokiselina poput arginina i lizina.

2.2 Razredbovanje transkripcijskih čimbenika

Transkripcijske čimbenike moguće je podijeliti s obzirom na razliku u strukturi domene koja veže DNA. Najčešći motivi koji se javljaju unutar proteina su: motiv uzvojnica-okret-uzvojnica (HTH, eng. helix-turn-helix), domena koja svija DNA (HMG, eng. high mobility group), uzvojnica-omča-uzvojnica (HLH, eng. helix-loop-helix), leucinski zatvarač (eng. leucine zipper) te motiv cinkovog prsta (eng. zinc finger).

2.2.1 Uzvojnica-omča-uzvojnica

Transkripcijski čimbenici koji se vežu za promotorsku regiju DNA i čimbenici koji djeluju kao pojačivači imaju najčešće motiv uzvojnica-omča-uzvojnica (10) (Slika 2.1). Proteini koji spadaju u ovaj razred vežu DNA preko dijela sastavljenog od 10-ak ostataka aminokiselina koji prethode prvoj α-uzvojnici. Uzvojnice se sastoje od hidrofobnih aminokiselina na svakom trećem ili četvrtom položaju, tako da uzvojnica ima hidrofobnu površinu u odnosu na okoliš. To omogućuje proteinu vezanje sa sličnim proteinima preko hidrofobnih interakcija te na taj način mogu nastati homodimeri i heterodimeri.



Slika 2.1 Motiv uzvojnica-omča-uzvojnica. Na slici su prikazana dva monomera koja su zajedno povezana: svaki monomer sastoji se od dvije alfa-uzvojnice povezane omčom (crveno). Preuzeto iz knjige Alberts i sur. (11).

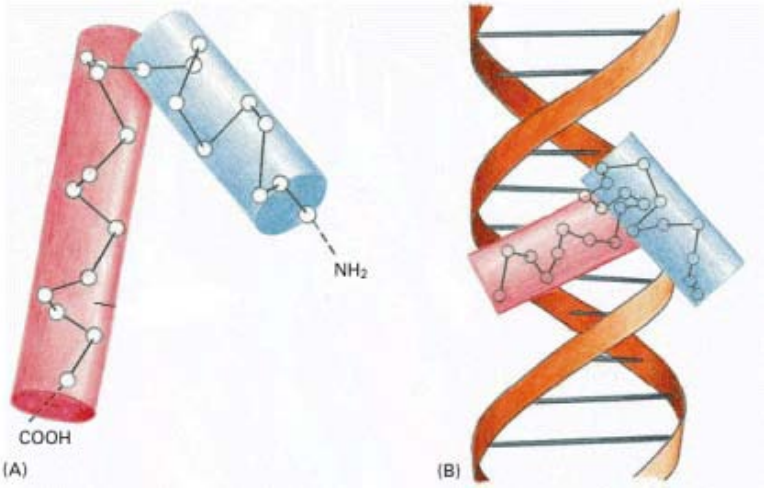
2.2.2 Leucinski zatvarač

Kao i obitelj transkripcijskih čimbenika HLH, obitelj transkripcijskih čimbenika s motivom leucinskog zatvarača je sačinjena od alfa-uzvojnica s omčama (Slika 2.2). Ime potječe od činjenice da je aminokiselina leucin na tom dijelu proteina vrlo česta (12). U ovoj obitelji leucinski ostaci smješteni na svakom okretu uzvojnice omogućuju hidrofobno sučelje za međudjelovanje dvaju proteina. Ustanovljeno je da je N-terminalni dio leucinskog zatvarača glavna regija odgovorna za prepoznavanje i vezanje specifičnih DNA sekvenci. Ovi čimbenici također mogu biti u obliku homodimera ili heterodimera.

Slika 2.2 Prikaz dviju alfa-uzvojnica koje se vežu za DNA putem područja nazvanog leucinski zatvarač, koje stvara oblik obrnutog slova Y prilikom vezanja na DNA. Svaki krak slova Y čini zasebna alfa-uzvojnica koja posreduje pri vezanju posebnog slijeda DNA. Preuzeto iz Alberts i sur. (11),

2.2.3 Uzvojnica-okret-uzvojnica

Domena koja veže DNA unutar transkripcijskih čimbenika koji spadaju u ovu podskupinu građena je od dvije alfa-uzvojnice između kojih se nalazi kratak slijed aminokiselina u obliku sekundarne strukture beta-okreta (13) (Slika 2.3). Uloga samog beta-okreta i prve uzvojnice je usmjeravanje druge uzvojnice prema površini proteina u orijentaciji koja će joj omogućiti pristajanje u veliki utor DNA molekule. Za razvoj mijeloidne i limfoidne loze jedan od bitnijih transkripcijskih čimbenika s opisanim motivom je i PU.1, koji se veže na dio DNA bogat purinima i regulira ekspresiju gena u koordinaciji s drugim transkripcijskim čimbenicima (14).



Slika 2.3 Motiv uzvojnica-okret-uzvojnica. Kod motiva (a) bijele kružnice predstavljaju vodikove atome aminokiselina. Alfa-uzvojnica smještena na C-kraju (crveno) naziva se još i prepoznavajuća uzvojnica, s obzirom na svoju ulogu pri vezanju na DNA. Alfa-uzvojnica smještena na N-kraju ima potpornu te strukturnu ulogu, koja pomaže pri smještanju prepoznavajuće sekvence. Preuzeto iz Alberts i sur. (11).

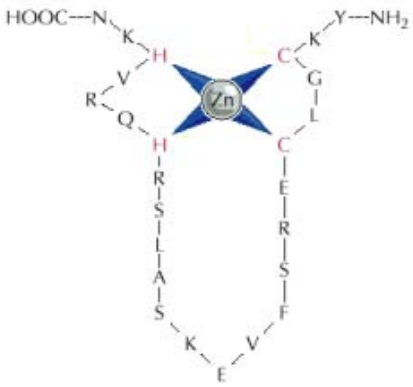
2.2.4 Domene koje svijaju DNA

Osim proteina koji vežu DNA postoje i oni proteini koji pomoću karakterističnih motiva svijaju DNA te na taj način omogućuju vezanje drugih aktivatora ili represora na određeni slijed dotične DNA. Većina tih proteina sadrži slijed HMG (eng. high mobility group) sastavljen od 80-ak aminokiselina koje posreduju u pristajanju proteina u mali utor DNA. Proteini koji svijaju DNA sposobni su tvoriti posebnu trodimenzionalnu strukturu čija je uloga iskrivljavanje zahvaćenog dijela DNA i omogućavanje vezanja drugih transkripcijskih čimbenika.

2.2.5 Transkripcijski čimbenici s motivom cinkovih prstiju

Centralni dio transkripcijskih čimbenika s motivom cinkovih prstiju čine jedan ili više atoma cinka. Svaki od ovih proteina ima dva ili više takvih motiva koji vežu DNA (najčešće do devet motiva). Postoji više podskupina transkripcijskih čimbenika s motivom cinkovih prstiju s obzirom na složenost građe, a jedna od njih označava se kao motiv C_2H_2 (15), gdje su domene povezane i svaka je stabilizirana s atomom cinka u sredini, koordiniranim od strane

dva cisteina i dva unutrašnja histidina (Slika 2.4). Većina proteina iz ove grupe se veže na DNA preko velikog utora.



Slika 2.4 Transkripcijski čimbenik s motivom cinkovih prstiju. Ovaj protein pripada obitelji transkripcijskih čimbenika s C_2H_2 motivom. Cistein (C) i histidin (H) koordiniraju atom cinka uzrokujući stvaranje omči izvan motiva cinkovih prstiju. Preuzeto iz Alberts i sur. (11).

Primjer proteina s motivom cinkovih prstiju je i obitelj transkripcijskih čimbenika Ikaros, u čiju skupinu, osim proteina Ikaros, spadaju i Helios, Aiolos, Eos te Pegasus (16).

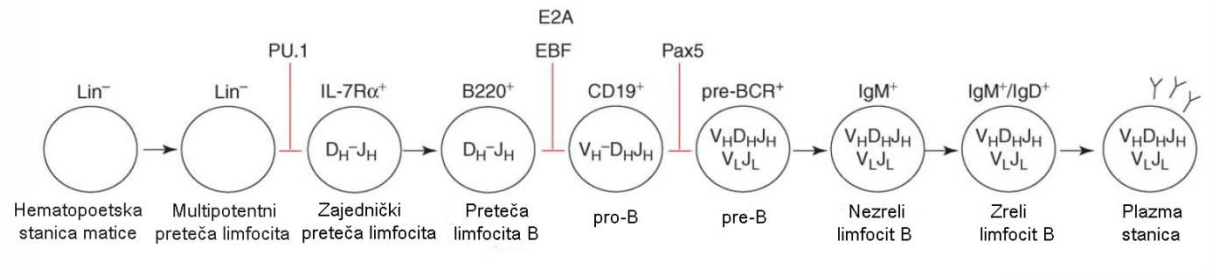
2.3 Uloga transkripcijskih čimbenika u hematopoezi

Stanice imunosnog sustava se u velikom broju izmjenjuju tijekom života, dok su mehanizmi koji omogućuju stvaranje te razvoj stanica iznova relativno nepoznati i neistraženi. Narušena pravilnost bilo kojeg koraka od početka udvostručavanja DNA, prepisivanja u glasničku RNA, prevođenja (translacije) na razinu proteina te post-translacijskih promjena, može dovesti do razvojnih poremećaja. Prepisivanje DNA u glasničku RNA jedna je od ključnih razina kontrole diferencijacije i sazrijevanja krvotvornih stanica. Uloge transkripcijskih čimbenika prilikom razvoja stanica imunosnog sustava u samom su žarištu znanstvenih istraživanja na području diferencijacije i sazrijevanja krvotvornih stanica. Transkripcijski čimbenici igraju ključnu ulogu u procesu hematopoeze te u moduliranju stanica matica pri diferencijaciji u izvedenije oblike stanica. Vaquerizas i sur. pokazali su kako je krv (samim time i proces hematopoeze) jedno od transkripcijski najaktivnijih tkiva pri čemu oko 8% ekspresije svih gena otpada na ekspresiju transkripcijskih

čimbenika (17). Međudjelovanja transkripcijskih čimbenika unutar regulacijske mreže eksprimiranih proteina bitan su kotačić pravilnog razvoja i sazrijevanja stanica dok bilo kakav oblik nepravovremenog prekomjernog ispoljavanja, delecije ili fuzije na razini gena mogu dovesti do nastanka razvojnih poremećaja (18).

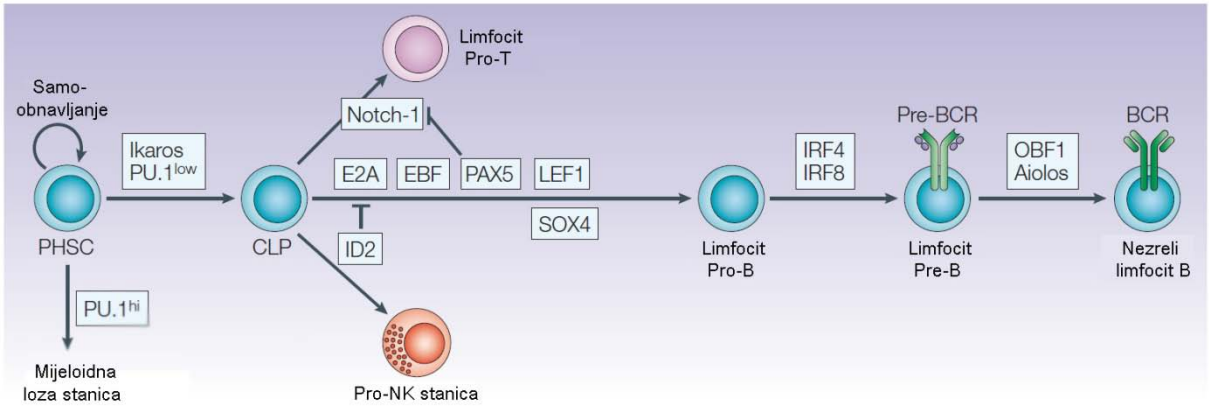
2.4 Transkripcijski čimbenici u razvoju limfocita B

Loze krvnih stanica nastale su diferencijacijom iz zajedničkog pluripotentnog hematopoetskog pretka, ishodišne stanice matice (HSC, eng. hematopoetic stem cell), prolazeći određene stadije pri kojima se smanjivao multipotentni potencijal samih stanica. Svakim danom u koštanoj srži nastaje velik broj limfocita B koji postupno sazrijevaju. Razvoj limfocita B karakteriziran je ekspresijom različitog skupa gena u različitim vremenskim odmacima tijekom diferencijacije. Postupak pri kojem se određuje sudbina sazrijevanja stanica reguliran je malim brojem transkripcijskih regulatora. Glavna obilježja razvoja limfocita B putem kojih je moguće pratiti proces diferencijacije su preslaganje imunoglobulinskih gena V(D)J, ekspresija preteče receptora limfocita B (pre-BCR, eng. pre B-cell receptor) te potom receptora limfocita B (BCR, eng B-cell receptor). Uvjet koji je potreban da stanica prijeđe iz ranog u kasni stupanj pre-B razvoja je da se preteča receptora limfocita B (pre-B) sastoji od imunoglobulinskog teškog lanca i zamjenskog lakog lanca (λ5) u kompleksu s V pre-B. Kompleks će moći dojavljivati putem koreceptorskih molekula Igα i Igβ te na taj način zaustaviti daljnje uređivanje kako bi se zaustavilo stvaranje drugog gena za teški lanac u istom limfocitu B (19). Stanice s eksprimiranim pretečom receptora limfocita B proliferiraju te im se povećava broj. Potom se potiče rekombinacija unutar gena koji daju uputu za laki lanac u svrhu ispoljavanja lakog lanca κ ili λ u kompleksu s proteinom IgH na površini stanice. Cijeli opisani postupak zahtijeva preciznu regulaciju od strane transkripcijskih čimbenika (Slika 2.5).



Slika 2.5 Razvoj limfocita B. Stupnjevi pojedinog razvoja stanice prikazani su ispod skice, preslaganje imunoglobulinskih gena te lanaca receptora limfocita B unutar skice, dok su površinski biljezi prikazani iznad skice stanice. Prilagođeno i preuzeto iz Hagman i sur. (20).

U ranom razvoju limfocita B vrijedi istaknuti transkripcijske čimbenike PU.1, čimbenike iz obitelji proteina E (E2A, EBF) te Pax5. PU.1 poznat je kao regulator mnoštva ranih i kasnih gena upletenih u razvoj limfocita B modulirajući strukturu kromatina ciljnih gena (21). Proteini E2A i EBF također su bitni u najranijim stupnjevima razvoja limfocita B; E2A posjeduju sposobnost vezanja kompleksa SAGA koji preobličuje kromatin, omugućavajući na taj način transkripciju mnoštva ciljnih gena. Slično kao i E2A, i EBF posjeduje domenu HLH putem koje aktivira transkripciju ciljnih gena. Ključan čimbenik pri determinaciji loze limfocita B je PAX5, koji ima ulogu represije većine gena koji su bitni za diferencijaciju stanica u druge loze. Istraživanje na miševima pokazalo je kako nedostatak Pax5 dovodi do gubitka osnovnih značajki zrelih limfocita B, neučinkovitog stvaranja limfoblasta te smanjenja koncentracije imunoglobulina G u serumu (22). Popis značajnijih čimbenika koji sudjeluju u razvoju limfocita B moguće je vidjeti na Slici 2.6.

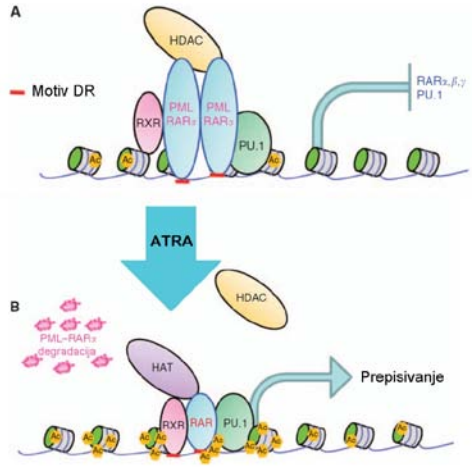


Slika 2.6 Razvoj limfocita B u koštanoj srži: prikaz najbitnijih čimbenika koji određuju diferencijaciju prema zrelim oblicima limfocita B. Popis skraćenica naveden je u popisu kratica. Prilagođeno i preuzeto iz Matthias i sur. (23).

2.5 Čimbenici i mehanizmi bitni za razvoj stanica mijeloidne loze

U razumijevanju diferencijacije hematopoetskih stanica matica prema mijeloidnoj lozi, od iznimne je važnosti otkriti te opisati transkripcijske čimbenike koji sudjeluju u tom procesu. Budući da su isti čimbenici odgovorni i za nastanak zloćudnih oboljenja (npr. akutna mijeloidna leukemija) detaljnije poznavanje njihove uloge u postupku diferencijacije, odnosno narušene funkcije, važno je i sa stajališta onkologije. Većina promotora mijeloidne loze posjeduje funkcionalno vezno mjesto za čimbenik PU.1 (u stanju vezati domenu "TATA box"), koji je ujedno vezanjem na čimbenik TBP (eng. tata binding protein) u stanju potaknuti ekspresiju cijelog niza čimbenika bitnih pri mijeloidnom usmjeravanju hematopoetskih stanica matica (24). S obzirom na nemogućnost samostalnog vezanja čimbenika TBP, većina čimbenika mijeloidne loze ovisna je o ekspresiji PU.1. Čimbenik PU.1 neizostavan je u reprogramiranju iz limfocitne prema mijeloidnoj lozi, pri čemu s PU.1 međudjeluje mnoštvo čimbenika (25, 26). Stvaranje mijeloidnih stanica usklađeno je relativno malim brojem eksprimiranih transkripcijskih čimbenika. Osim PU.1, najvažniji među njima su RARα, RARβ, RAR γ (eng. Retinoic acid receptor alpha, beta, gamma), C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein), GFI1 (eng. growth-factor independent 1), IRF8 (eng. interferon-regulatory factor 8), RUNX1 (eng. runt-related transcription factor 1), MYC te Ikaros (27). Put dojavljivanja Notch je također bitan kod poticanja diferencijacije više mijeloidnih loza kroz pozitivnu kontrolu ekspresije PU.1 (28).

Neki od mehanizama diferencijacije stanica preteča prema mijeloidnoj lozi otkriveni su prilikom proučavanja mijeloidnih leukemija. Jedan od proučavanijih modela je onaj putem čimbenika RARα, smještenog u jezgri. Činjenica kako nedostatak vitamina D vodi neuobičajenom postupku stvaranja krvotvornih stanica (29), kao i otkriće fuzijskog proteina PML-RARα u slučaju akutne promijelocitne leukemije (30) dovelo je do rasvjetljavanja dojavljivanja putem čimbenika RARα. U tom procesu čimbenik RARα stvara heterodimer s RXRα (eng. retinoid X receptor α), što omogućuje vezanje za promotorsku regiju ciljnog gena nazvanu RARE (eng. retinoic acid response element). Heterodimer uz pomoć dodatno vezanih korepresora (SMRT, NcoR, mSin3A) je sposoban vezati kompleks HDAC (eng. histone deacetylase) i dovodi do deacetilacije, odnosno utišavanja ekspresije RARE. Retinoična kiselina (ATRA, eng. All trans retinoic acid) se može vezati za sve tri vrste receptora RAR (α, β, γ), čime uzrokuje konformacijsku promjenu unutar dimera RXR-RAR, koja uzrokuje otpuštanje kompleksa HDAC te novačenje koaktivatora poput p300/CBP, što dovodi do acetilacije histona te aktivacije transkripcije (31). U slučaju nastanka PML-RARα mutacije, novonastali fuzijski protein se veže na RARE u kompleksu s HDAC i onemogućava transkripciju. S obzirom na to da fiziološka koncentracija retinoične kiseline nije dovoljno visoka za odvajanje kompleksa HDAC, dolazi do zastoja u sazrijevanju preteča mijeloidne loze (Slika 2.7). Stvaranje fuzijskog proteina pogađa put dojavljivanja retinoičnom kiselinom na više načina: regulirajući ekspresiju uključenih gena, mijenjajući uobičajen put dojave putem heterodimera RAR/RXR te povećanjem opsega potencijalnih mjesta na koja se fuzijski protein može vezati na razmaknute ponavljajuće sljedove (DR, eng. Direct repeats) unutar promotorskih mjesta (uobičajen put dojavljivanja uključuje vezanje RAR i RXR samo na motive DR2 te DR5 unutar promotorskih regija, dok fuzijski protein ima sposobnost vezanja i na motive DR1, DR3 te DR4) (32). Pokazano je kako PML-RARα međudjeluje s čimbenikom PU.1 na način da fuzijski protein uzrokuje smanjenje aktivnosti PU.1 (33). Osim toga, Alcalay i sur. pokazali su kako fuzijski proteini kod mijeloidne leukemije utječu na povišenu ekspresiju liganda Jagged1 unutar puta dojavljivanja Notch (34).



Slika 2.7 Model vezanja PML-RARα (a) PML-RARα, zajedno s RXR te PU.1 veže se na motive DR, novači kompleks HDAC te uzrokuje utišavanje ciljnog gena. (b) Po dodatku ATRA, dolazi do raspada PML-RARα, čime se fuzijski protein zamjenjuje heterodimerom RARα-RXR, pri čemu dolazi do aktivacije transkripcije. Prilagođeno i preuzeto iz Saeed i sur. (32).

2.6 Diferencijacija u smjeru mijeloidne loze potaknuta agensom PMA

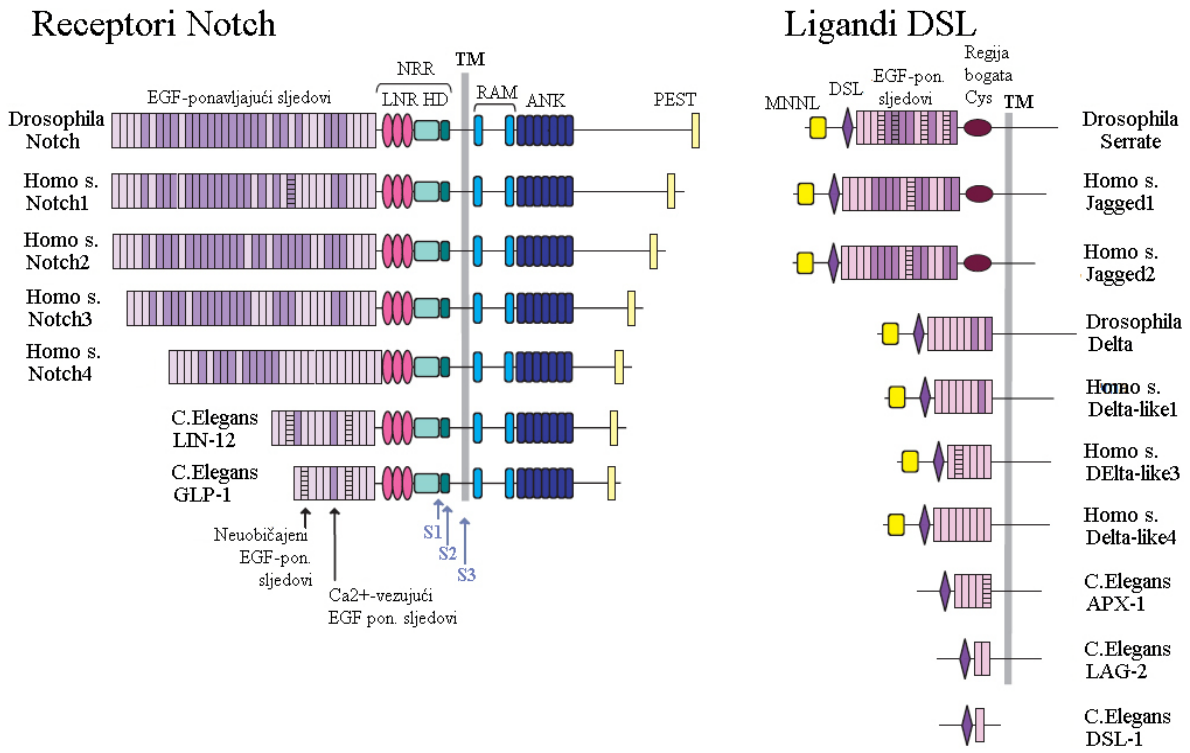
Forbol 12-miristat-13-acetat (PMA) poseban je aktivator obiju grupa (A- α, βI, βII, γ te B- δ, ε, η, θ) proteina kinaze C (PKC). Skupina forbol estera, kojoj pripada i PMA, djeluje na PKC oponašajući prirodni ligand, malu molekulu diacilglicerola (DAG). Kod mijeloidnih leukemijskih loza stanica aktivacija s PMA dovodi do zastoja u rastu te pojave fenotipa karakterističnih za monocitnu lozu stanica. Fiziološki odgovor mijeloidnih leukemijskih loza stanica na PMA povezan je s aktivacijom kinaze c-Jun te transkripcijskih čimbenika Elk-1 te ATF2. Također je otkriveno da je prilikom diferencijacije mijeloidne leukemijske loze stanica U937 izazvane s PMA neophodna ekspresija transkripcijskog čimbenika MS-2, koji sudjeluje u kontroli ekspresije površinskih biljega (35). Nadalje, poznato je kako ciljana diferencijacija s PMA uzrokuje i stvaranje reaktivnih kisikovih radikala (ROS, eng. reactive oxygen species) (36) te utječe na niz promjena u ekspresiji niza površinskih biljega (37).

2.7 Put dojavljivanja Notch

Put dojavljivanja Notch pripada skupini visoko konzerviranih mehanizama unutar stanice, koji je prisutan u većini višestaničnih organizama (38). Prvotno je otkriven u vinskoj

mušici, gdje je mutacija gena notch pridonosila posebnom izgledu krila mutantnih jedinki, sa savršenim urezima na njihovoj površini (eng. Notch= zarez, urez) te je također otkriveno da se radi o spolno vezanom genu smještenom na kromosomu X (39). Zbog izuzetne važnosti radi se o evolucijski sačuvanom putu dojavljivanja koji je prisutan kod svih Metazoa te je najvjerojatnije postojao kao funkcionalan oblik čak kod Urmetazoa (40).

Intenzivno zanimanje istraživača za ulogu Notcha uslijedilo je krajem prošlog stoljeća, nakon saznanja o povezanosti Notcha s akutnom leukemijom T-limfocitne loze (T-ALL) (41). Mreža molekula koje sudjeluju u putu dojavljivanja Notch kod ljudi sastoji se od 4 receptora (Notch 1-4) te liganada koji su dio obitelji liganada Delta-like (eng. Dll1, Dll3 te Dll4) te Jagged (Jag1, Jag2) (Slika 2.8). Transkripcijski čimbenik Notch se na N-kraju vanjske domene sastoji od ponavljajućih sljedova koji liče epidermalnom čimbeniku rasta (EGF-like repeat, eng. epidermal growth factor-like repeat), čija je uloga vezanje liganda. Svaki slijed sastoji se od četrdesetak aminokiselina unutar kojih je smješteno 6 cisteina koji tvore disulfidne mostove. Negativna regulatorna regija receptora (NRR) smještena je između domene koja veže ligand te transmembranskog dijela molekule. Sastoji se od tri ponavljajuća slijeda bogata cisteinskim ostacima (LNR, eng. LIN-12-Notch repeats) i heterodimerizacijske domene (HD, eng. heterodimerization domain), čija je uloga otpornost na metaloproteinazu u odsustvu vezanja liganada (42). Unutarstanični dio Notcha (NICD, eng. Notch intracellular domain) sastoji se od regije RAM (eng. recombination binding protein-J-associated molecule), ankirinske regije te slijeda PEST (eng. proline-glutamate-serine-threonine-rich) na samom C-kraju proteina. Uloga regije RAM sastoji se u omogućavanju interakcije s proteinom CSL (CBF1 kod sisavaca, Su(H) kod vinske mušice te Lag-1 kod C. elegans). Ankirinska regija sastoji se od ponavljajućih sljedova i ključna je za funkciju samog Notcha. Svaki slijed sastoji se od 33 aminokiseline koje tvore sekundarnu strukturu obrnuto okrenutih uzvojnica koje su B-omčom spojeni s narednim slijedom (43). Vezanje na CSL događa se putem stabilnih interakcija s regijom RAM (jače veze) te ankirinskom (slabije veze) domenom (44). Vezanje s kompleksom MAML1 (eng. Mastermind like 1) događa se isključivo preko ankirinske domene (45). Domena PEST isključivo je zadužena za degradaciju te stvaranje proteasoma vođenog prethodnim ubikvitiniranjem (46).

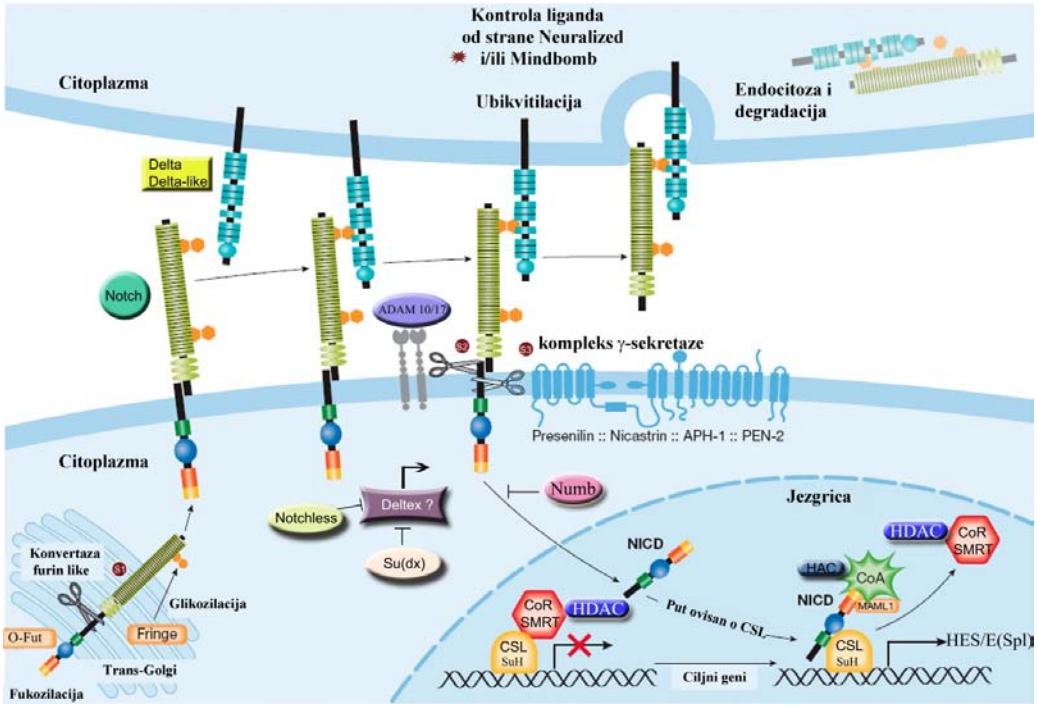


Slika 2.8 Organizacija domena članova puta dojavljivanja Notch. Prikazana je shema receptora (lijevo) te liganada (desno) podrijetlom iz čovjeka, vinske mušice te C. elegans. S1-S3 predstavlja mjesto cijepanja proteazama. Preuzeto iz Gordon i sur. (42).

Mehanizam puta dojavljivanja Notch uključuje tri zasebna proteolitička koraka, nakon kojih se signal putem unutarstanične domene molekule Notch prenosi u jezgru. Prvo proteolitičko cijepanje posredovano proteazom PC5/furin događa se u trans-Golgijevom aparatu pri čemu nastaje heterodimer povezan nekovalentnim vezama, sastavljen od izvanstanične te unutarstanične domene spojene s transmembranskim dijelom. Prilikom vezanja receptora s nekim od odgovarajućih liganada, dolazi do drugog cijepanja, posredovanog proteazom ADAM (eng. A disintegrin and metalloprotease), koje dovodi do stvaranja izvanstaničnog dijela molekule NEXT (eng. Notch extracellular truncation) slabo povezanog s membranom. Prijelazni oblik receptora u postupku odbacivanja služi kao supstrat γ-sekretazi, koja cijepa preostali dio receptora na dva mjesta unutar membranskog dijela. Po cijepanju γ-sekretazom, dolazi do premještanja NICD u jezgru, gdje tvori kompleks s proteinom CSL (Slika 2.9), što dovodi do novačenja dodatnih koaktivatora (Mastermind kod vinske mušice i sisavaca, Lag-3 kod C.Elegans) (47). Nastali kompleks veže se s kompleksom

odgovornim za aktivaciju transkripcije (MED8) što za posljedicu ima prepisivanje nizvodnih ciljnih gena (48), od kojih su najpoznatiji članovi obitelji HES (eng. Hairy enhancer of split), HERP (eng. Hes related repressor protein) te Deltex1. Osim regulacije navedenih gena Notch ima važnu ulogu i u regulaciji ekspresije transkripcijskog čimbenika PU.1, koji isudjeluje u usmjeravanju diferencijacije stanica matice prema mijeloidnoj, odnosno limfoidnoj lozi (28). Aktivacija Notcha važan je dio mnogih procesa unutar stanice, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, hematopoezu, onkogenezu, embriogenezu te apoptozu.

Put dojavljivanja Notch1 jedan je od glavnih elemenata prilikom usmjeravanja diferencijacije limfocita. Pui i sur. (1999.) pokazali su da se konstitutivnim ispoljavanjem Notch1, diferencijacija pomiče u smjeru razvoja limfocita T na štetu razvoja limfocita B (49). Kod miševa je put dojavljivanja Notch neophodan pri procesu beta-selekcije timocita (50). Pokazano je u perifernim limfocitima T da Notch utječe na ekspresiju interferona-γ preko aktivacije NF-κB, transkripcijskog čimbenika odgovornog za proliferaciju, diferencijaciju, stanično preživljenje te zloćudnu transformaciju (51).

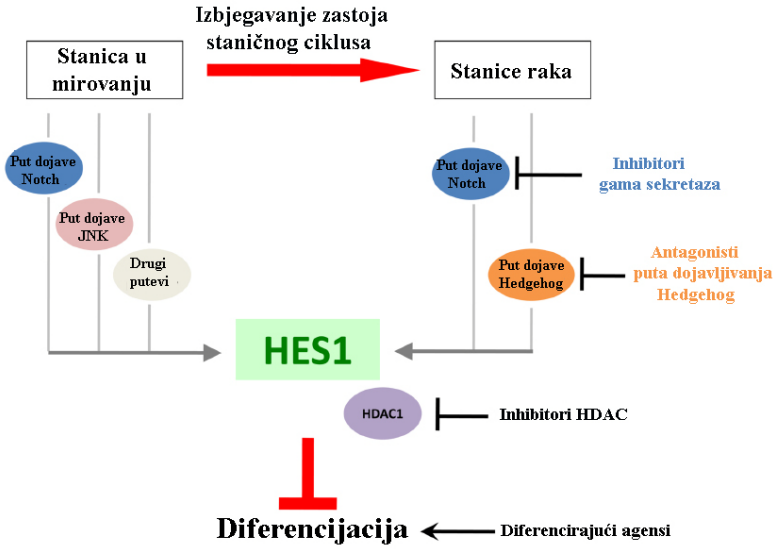


Slika 2.9 Put dojavljivanja Notch. Preuzeto iz Gazave i sur. (40).

Mutacije čimbenika koji čine put dojavljivanja Notch uzrokuju mnoge poremećaje koji zahvaćaju većinu tkiva poput krvožilnog sustava, očiju, bubrega, srca, mozga i jetre. Nekoliko bolesti izravno je povezano s putem dojavljivanja Notch poput: Alagilleovog sindroma (mutacija Jagged1), spondilokostalne dizostoze (upletenost Dll3, Hes7, Lunatic fringe), sindroma Hajdu Cheney (mutacije gena za Notch2) te Alzheimerove bolesti (upletenost gama-sekretaze) (52, 53). Metodom detaljnog sekvenciranja pokazano je kako je put dojavljivanja Notch uključen i kod nekoliko ljudskih oblika raka, no za razliku od većine transkripcijskih čimbenika, uloga mu je dvojaka; može se ponašati i kao onkogen i kao supresor tumora (54). Kao što je prije pokazano, najbolje proučen utjecaj čimbenika Notch je kod akutne leukemije limfocita T, pri čemu su najčešći uzrok razvoja bolesti točkaste zamjenske mutacije te male delecije unutar okvira čitanja, koje omogućuju konstitutivnu ekspresiju Notcha (55). Također, uzrok razvoja bolesti mogu biti i mutacije u sklopu domene PEST na C-kraju samog proteina. Osim T-ALL, onkogeni utjecaj Notcha opisan je i u drugim vrstama leukemija poput kronične leukemije limfocita B (Notch1,2) (4), mijeloidne leukemije (5, 6) te karcinoma dojke (Notch1, 4) (56). Potisnuto ponašanje puta dojavljivanja Notch opisano je po prvi put od strane Nicolasa i sur. (57). Istraživanja na miševima kojima je nativna uloga gena Notch1 ciljano isključena dovela su do spontanog razvoja raka kože (57). Također, Viatour i sur. dokazali su kako put dojavljivanja Notch ima ulogu supresora tumora u slučaju raka jetre (58). Nicolas i sur. (2003) predložili su da funkcija supresora tumora Notch1 djeluje kroz supresiju puteva dojavljivanja Wnt te Sonic Hedgehog (57). U istom radu pokazano je kako se spontane lezije karcinoma bazalnih stanica pojavljuju odmah po deleciji Notch1 u koži miševa starih sedam dana. Nadalje, ekspresija dominantno negativnog oblika transkripcijskog čimbenika člana puta dojavljivanja Notch, MAML1 dovela je kod miševa do razvoja karcinoma epitelnih stanica (59). Prilikom istraživanja rađenog na štakorima koji su kronično bili izloženi protutijelu čija je svrha bila blokirati ligand Dll4 puta dojavljivanja Notch, došlo je do razvoja supkutanih tumora te nepravilnosti povezanih s aktivacijom stanica endotela (60). Također, namjerno izazvana deficijencija gena za Notch (pomoću sustava Cre-LoxP) kod miševa dovela je do pojave i širenja vaskularnog tumora (61).

Hes1 je jedan od istraženijih nizvodnih članova puta dojavljivanja Notch, no moguće je potaknuti transkripciju Hes1 neovisno o Notchu uz pomoć aktivacije putem JNK (eng. c-Jun N-terminal kinase) (62) ili preko puta dojavljivanja Sonic Hedgehog (Slika 2.10) (63).

Ukoliko je aktivacija Hes1 izazvana putem dojavljivanja Notch, Hes1 se u tom slučaju ponaša kao represor transkripcije. Transkripcijski čimbenik Hes1 u većini stanica ima ulogu represora te je eksprimiran u gotovo svim nediferenciranim stanicama (64). Glavni mehanizam djelovanja čimbenika Hes1 je utišavanje aktivnosti drugih čimbenika ili novačenje kofaktora iz obitelji TLE, čija je jedna od glavnih sposobnosti novačenje kompleksa HDAC i deacetilacija histona, a time represija transkripcije (65, 66). Miševi kojima nedostaje Hes1 pokazuju znakove preranog sazrijevanja stanica te ozbiljne poremećaje mozga, oka te gušterače (67).



Slika 2.10 Uloga Hes1 u utišavanju transkripcije te pojavi zloćudnih oboljenja. Preuzeto iz Sang i sur. (68).

Transkripcijski čimbenik Deltex1 posjeduje regiju sastavljenu od bazičnih aminokiselina na N-kraju proteina gdje se veže za ankirinske ponavljajuće sljedove unutarstanične domene proteina Notch (69). Deltex1 regulira aktivnost čimbenika Notch ometajući međudjelovanje čimbenika Notch i Hes. Kako je poznato, kod sisavaca Notch djeluje na transkripciju čimbenika Deltex1 te je njihova uzajamna regulacija povezana mehanizmom pozitivne povratne sprege (69). Pokazano je kako Deltex1 čini kompleks s čimbenicima Notch i beta-arestina, posredujući u degradaciji unutarstaničnog dijela Notcha. Deltex1 igra bitnu ulogu i pri ubikvitinaciji članova drugih puteva dojavljivanja, poput ciljane degradacije članova puta dojavljivanja MAPK (eng. mitogen activated protein kinase) (70).

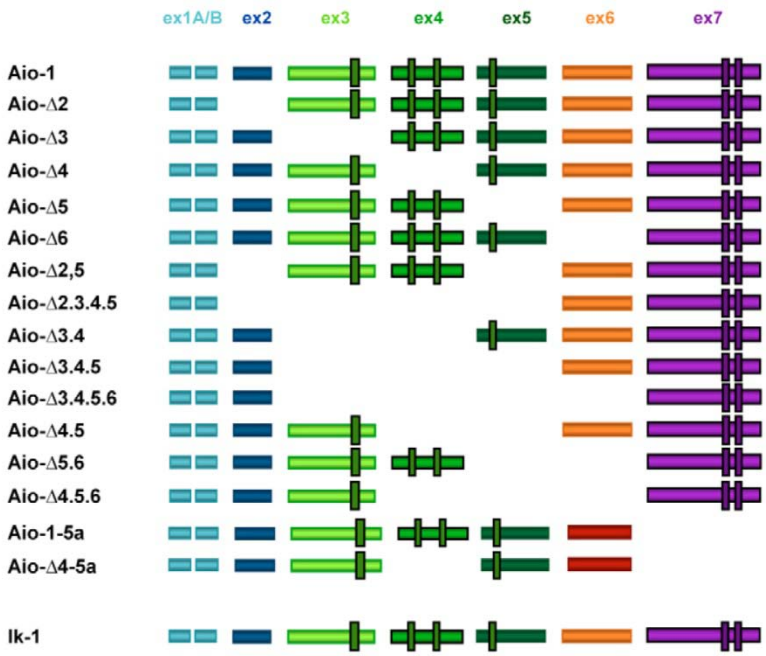
2.8 Obitelj transkripcijskih čimbenika Ikaros

Obitelj transkripcijskih čimbenika Ikaros spada u obitelj proteina strukturno prepoznatljivih po motivima cinkovih prstiju, koji su raspoređeni u dvije grupe, na N-terminalnom (bitan za vezanje na DNA) i C-terminalnom dijelu sekvence, putem kojeg protein može tvoriti homo- ili heterodimere (71). Radi se o konzerviranoj obitelji koju čini 5 članova: Ikaros, Helios, Aiolos, Eos te Pegasus (72).

Protein Ikaros prvotno je identificiran u miševa kao čimbenik koji se veže za pojačivač gena CD3δ (73). Naknadno je pokazano da Ikaros sudjeluje u regulaciji niza gena specifičnih za razvoj limfoidnih loza stanica kao što su: VpreB, Lck, CD8α, IL-R2, TCRα, TCRβ, λ5 (71).

Gen *ikaros* eksprimiran je u hematopoetskim stanicama matica, stanicama pretečama limfoidne loze, zrelim limfocitima T i B te stanicama NK odraslih miševa (74). Slična ekspresija potvrđena je i kod ljudi (75). Ekspresija Ikarosa potvrđena je i u mozgu, tj. u neuronima striatusa (76).

Gen *ikaros* nalazi se u blizini gena za epidermalni čimbenik rasta na kraćem kraku kromosoma 7 u, evolucijski očuvanom, lokusu kod ljudi (75). Sadrži 7 egzona čijim prepisivanjem i različitim kombinacijama prekrajanja može nastati velik broj izoformi (Slika 2.11) (71, 77).



Slika 2.11 Shematski prikaz inačica transkripcijskog čimbenika Aiolos, nastalih postupkom prekrajanja. Zelene oznake unutar egzona 3-5 označavaju motive cinkovih prstiju pomoću kojih čimbenici vežu DNA, dok ljubičaste oznake na C-kraju proteina označavaju motive cinkovih prstiju potrebne prilikom dimerizacije s drugim proteinima. Preuzeto iz Ballestar i sur. (77).

Obitelj proteina Ikaros spada u proteine koji vežu DNA s C2H2 motivom cinkovih prstiju te pripada obitelji transkripcijskih čimbenika Krűppel koji imaju prostorno odijeljene motive smještene na C-kraju i N-kraju. Motivi na N-kraju, putem koje obitelj Ikaros veže DNA od iznimne su važnosti za diferencijaciju limfocita (78). Izoforme koje imaju više od dva motiva cinkovih prstiju na N-kraju mogu vezati DNA dok ostale ne mogu. Nedavno istraživanje pokazalo je kako motivi na N-kraju različito pridonose vezanju DNA, s obzirom na to da nisu istodobno svi motivi cinkovih prstiju potrebni za vezanje DNA. Tako npr. prvi i četvrti motiv igraju bitnu ulogu prilikom limfopoeze, dok je četvrti motiv neophodan kod uloge Ikarosa kao tumor supresora (79). Također, primjećeno je kako su kod svih izoformi prisutna dva motiva na C-kraju dok se na N-kraju kod Ikarosa, Heliosa, Aiolosa te Eosa pojavljuju četiri motiva cinkovih prstiju (71). Kod transkripcijskog čimbenika Pegasus se jedino pojavljuju tri motiva cinkovih prstiju na N-kraju proteina (80). Neposredno ispred dimerizacijske domene nalazi se još jedna domena koja je bitna za aktivaciju koja se sastoji

od kiselih i hidrofobnih aminokiselina. Kisele su zadužene za aktivaciju transkripcije kada se ostvari kontakt ciljnog gena s domenom na amino kraju, dok hidrofobne stabiliziraju veze s osnovnim transkripcijskim kompleksom (81).

Ik-1 je najduža izoforma koja sadrži sve moguće motive cinkovih prstiju. Nakon sinteze Ik-1 i Ik-2 (nedostaje mu motiv cinkovog prsta najbliži N-kraju) ulaze u jezgru gdje potiču transkripciju ciljnih gena. Ik-3 i Ik-4 su pretežno smješteni u citoplazmi te su puno slabiji aktivatori transkripcije. Tek je Ik-4 nađen u značajnijoj količini u ranim precima limfocita T (71). Ostale izoforme Ikarosa nemaju uopće mogućnost vezanja DNA te se nazivaju dominantno-negativne izoforme. Kod miševa su rađeni pokusi uvođenjem mutacije (delecije) egzona 3 i 4 što kod homozigotnih dominantno negativnih miševa ($DN^{-/-}$) dovodi do zaustavljanja razvoja svih limfoidnih loza uključujući limfocite T, B i NK (82). No, heterozigotni miševi ($DN^{+/-}$) razvijaju sve limfoidne loze iako je opaženo da se u tom slučaju pojavljuju leukemije i limfomi u roku 3 do 6 mjeseci. Pokazano je kako smanjenje i gubitak aktivnosti Ikarosa dovodi do aberantne proliferacije limfocita T nakon aktivacije, što potvrđuje ulogu Ikarosa u supresiji nastanka tumora (83, 84). Ikaros također ima ulogu u utišavanju gena (85). Proteini Ikaros većim su dijelom smješteni u području centromernog heterokromatina u jezgri proliferirajućih limfocita, a promjene strukture kromatina se povezuju s utišavanjem transkripcije (86). Također je dokazana prisutnost Ikarosa u kompleksu NuRD (eng. nucleosomal remodeling and histone deacetylase) s ATP-azom Mi-2β i histonskom deacetilazom (HDAC). Smanjenje Ikarosa povećava vezanje kromatina s kompleksom NuRD, deacetilaciju histona te utišavanje gena. Kompleks NuRD također može međudjelovati s represorskim kompleksom Polycomb, čime dolazi do aktivacije gena povezanih s proliferacijom (87). Osim tog kompleksa, značajan udio Ikarosa vezan je uz kompleks SWI/SNF (eng. SWItch/Sucrose NonFermentable), koji oblikovanjem nukleosoma olakšava transkripciju (88). Ikaros je ključan čimbenik pri razvoju hematopoetskih stanica matica prema limfoidnoj i mijeloidnoj lozi te nastanku prve usmjerene stanice s potencijalom ograničenim na razvoj limfoidne i mijeloidne loze (LMPP, eng lymphoyd-primed multipotent progenitor) (89). Među ostalim, Ikaros regulira i ekspresiju ciljnih gena puta dojavljivanja Notch kompetitivnom inhibicijom s proteinom RBPjκ (eng. Recombining binding protein suppressor of hairless) s kojim dijeli isto vezujuće mjesto za DNA (90). Ista grupa autora

pokazala je kako Ikaros i Notch djeluju antagonistički na ekspresiju nekoliko ciljnih gena puta dojavljivanja Notch (91).

2.9 Proliferativni poremećaji

Novotvorine krvotvornog tkiva mogu se podijeliti prema tijeku bolesti, podrijetlu stanica te prema stupnju agresivnosti u odnosu na zdravo tkivo (dobroćudni ili zloćudni). Leukemija je zloćudni oblik novotvorina unutar kojih je moguće razlikovati akutne i kronične stupnjeve leukemije. Leukemije (grč. leukos-bijel, aima-krv) su zloćudne bolesti krvotvornih stanica koje zahvaćaju koštanu srž i perifernu krv. Akutne leukemije su sve vrste leukemija koje karakterizira bujanje nezrelih stanica, dok je za kronične karakteristično umnožavanje zrelijih stanica zastalih u određenom stupnju razvoja. Iz navedenog razloga je tijek kroničnih leukemija polaganiji, s manjim stupnjem zloćudnosti u odnosu na akutne leukemije (55, 92).

Kroničnu leukemiju limfocita B, najčešću vrstu leukemije kod odraslih, karakterizira klonska proliferacija te nakupljanje zrelijih oblika limfocita B. Javlja se većinom u osoba starijih od 50 godina, nešto češće kod muškaraca. Radi se o veoma heterogenoj bolesti koju karakterizira monoklonska populacija limfocita B s eksprimiranim površinskim biljezima CD5, CD19 te CD23, uz smanjenu razinu membranskih IgM i IgD te biljega CD79b (93). Ishod i tijek, s obzirom na samu heterogenost bolesti, moguće je donekle odrediti praćenjem ekspresije različitih prognostočkih čimbenika poput ZAP70, CD38, mutacijskog statusa gena IGHV (eng. Immunoglobulin heavy chain variable region genes), mutacijskog statusa gena TP53, te nekih citogenetskih karakteristika (94, 95), iako se osnovno stupnjevanje bolesti najčešće vrši prema parametrima koje su razvili Binet sa sur. (96) te Rai sa sur. (97). Jakšić i sur. također su razvili metodu određivanja ukupne mase tumora kao jedan od parametara pri razredbovanju stupnja bolesti (98). Pretpostavlja se da je podrijetlo zloćudnosti klona B-CLL limfocita potrebno tražiti već u stupnju samoobnavljajuće hematopoetske stanice matice (99), iako druga istraživanja govore i o ideji kako B-CLL nastaje iz limfocita B marginalne zone (100, 101). Pokazano je kako je proces apoptoze jedan od bitnijih pri nastanku bolesti, s obzirom na veliku ekspresiju proteina Bcl-2 koji ima protuapoptotsku ulogu (102). Billot i sur. pokazali su da Aiolos kontrolira preživljenje limfocita B-CLL regulirajući ekspresiju nekih članova obitelji Bcl-2 (103). Također, aktivacija puta dojavljivanja Notch također

izravno utječe na pojavu apoptoze kod osoba oboljelih od B-CLL, spašavajući zloćudni klon limfocita B od nastanka apoptoze (4).

Akutnu mijeloidnu leukemiju (AML) karakterizira brza proliferacija abnormalnih stanica koje se nakupljaju u koštanoj srži, pri čemu dolazi do preklapanja sa stvaranjem normalnih krvnih stanica. Slično kao i u slučaju B-CLL, podrijetlo zloćudnog klona stanica AML-a ima izvorište u hematopoetskim stanicama maticama ograničenog potencijala diferencijacije prema mijeloidnoj lozi (104, 105). Najčešća je vrsta akutne leukemije kod odraslih, a zahvaća otprilike 20% leukemijskih oboljenja kod djece (106). Prema važećim kriterijima stupnjevanja AML (107) moguće je razlikovati osam razreda (M0-M7) koji se međusobno, između ostalog, razlikuju i po translokaciji karakterističnoj za određeni stupanj (26). Jedna od poznatijih i najproučavanijih je translokacija t(15;17) pri kojoj nastaje fuzijski protein PML-RARα. U nastanku i razvoju AML sudjeluju i dodatni čimbenici kao što su tirozinske kinaze Flt3 i c-Kit, koje mogu potaknuti i put dojavljivanja RAS te na taj način stanici pružiti signale za nastavak proliferacije (108).

2.10 Obitelj Ikaros i put dojavljivanja Notch u proliferativnim poremećajima

Za normalnu limfopoezu od iznimne su važnosti, kako čimbenici iz obitelji Ikaros, tako i put dojavljivanja Notch. Mutacije koje su odgovorne za smanjenje aktivnosti Ikarosa te za povišenje aktivacije Notcha odgovorne su za promicanje leukemogeneze. Pokazano je kako Ikaros upravlja ekspresijom nekoliko ciljnih gena, koji su ujedno povezani s putem dojavljivanja Notch, kao što su pTα, Hes1, Deltex1, Gata3 te Runx1 (90). Mehanizam supresije gena Hes1, kao zajedničkog ciljnog gena Notch i Ikaros puteva objašnjen je kooperativnim vezanjem Ikarosa za promotorsko mjesto gena Hes1, zajedno s vezanjem transkripcijskog represora RBPjκ u nezrelim mišjim timocitima (91). Ista grupa autora pokazala je također da je represor RBPjκ neučinkovit u odsustvu Ikarosa. Utjecaj ostalih transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros na put dojavljivanja Notch je relativno neistražen.

U nekim slučajevima Notch1 se također ponaša kao onkoprotein. Njegova uloga najbolje je proučena u T-ALL, agresivnom obliku leukemije koja uglavnom pogađa djecu i adolescente. Weng i sur. (2004) su otkrili da je Notch1 mutiran u 56% proučavanih slučajeva koji boluju od T-ALLa (55). Identificirane su dvije žarišne točke podložne za mutacije unutar

gena za Notch: domene HD te PEST. Poslije otkrića proto-onkogenih svojstava Notcha u ljudi oboljelih od T-ALL, njegova uloga dokazana je i u drugim tumorima, poput raka dojke, debelog crijeva, pluća te melanoma (109). Nedavna istraživanja ukazala su na mogući poremećaj zbog mutacija Notcha u kroničnoj leukemiji limfocita B (B-CLL, eng. B cell chronic lymphocitic leukemia). Mutacije otkrivene u tim istraživanjima pokazale su kako je Notch1 primarno mutiran kod pacijenata s agresivnijim stadijem bolesti te lošijom prognozom, kao npr. kod Richterovog sindroma, pri kojem se leukemijske stanice transformiraju u brzorastući difuzni limfom. Notch1 bio je mutiran u 31% slučajeva pacijenata s Richterovim sindromom te je 20,8% pacijenata s oblikom CLL-a otpornim na lijekove imalo mutiran Notch1. Većina mutacija smještena je u domeni PEST (110, 111). Rezultati dosadašnjih istraživanja Notch u patogenezi B-CLL nisu jednoznačni. Rosati i sur. pokazali su prekomjernu ekspresiju Notch1 i Notch2, predlažući prekomjernu aktivaciju puta dojavljivanja Notch kod oboljelih od B-CLL (4). Nasuprotno, Hajdu i sur. pokazali su kako na razini glasničke RNA put dojavljivanja Notch nije prekomjerno aktiviran u osoba oboljelih od B-CLL (112).

Novija istraživanja usmjerena su na ulogu Notcha u procesu apoptoze. Apoptoza je aktivni mehanizam ciljanog odumiranja stanica te su mnogi čimbenici uključeni u regulaciju ovog iznimno važnog procesa. Jedan od utjecajnijih čimbenika na proces apoptoze je put dojavljivanja Notch. Prijašnja istraživanja pokazala su kako loza mišjih fibroblasta OP9 potpomaže preživljenje hematopoetskih preteča stanica, dok su Kamdje i sur. pokazali kako mezenhimske stanice koštane srži oboljelih čuvaju stanice B-CLL od procesa apoptoze (113) (114). Rosati i sur. pokazali su kako je upravo konstitutivna ekspresija Notch1 odgovorna za inhibiciju apoptoze (4), dok su Hubmann i sur. otkrili kako inhibicija puta dojavljivanja Notch može dovesti do iniciranja apoptoze u stanicama B-CLL (115). Proturječni rezultati dobiveni su u slučaju akutne mijeloidne leukemije (AML), gdje su Zhang i sur. pokazali kako je ekspresija Dll4 i Notch1 značajno viša kod osoba oboljelih od AML u odnosu na zdrave osobe (116). Kannan i sur. pokazali su upravo suprotno na razini ekspresije Notch1 te pokazali kako Notch1 može inhibirati rast stanica te potaknuti apoptozu ovisnu o kaspazama (5). Tohda i sur. došli su do zaključka kako ligandi puta dojavljivanja Notch pod određenim uvjetima više pogoduju smjeru diferencijacije stanica nego samoobnavljanja stanica AML (117). Konstitutivno eksprimiran i aktiviran put dojavljivanja Notch ima bitnu ulogu u

otpornosti stanica B-CLL na apoptozu kao rezultat povišene aktivnosti NF-κB te ekspresije inhibitora apoptoze c-IAP (4). Uloga Notch1, 2 i 4 u inhibiciji apoptoze vidljiva je kroz povišenu ekspresiju inhibitora apoptoze Bcl-2 i transkripcijskog čimbenika NF-κB, odnosno sniženu ekspresiju apoptotskog gena kaspaze 3 (113). U slučaju B-CLL na povišenu ekspresiju Bcl-2 djeluje i transkripcijski čimbenik Aiolos, koji putem veznih mjesta na promotorskom mjestu gena može regulirati njegovu ekspresiju. Također je primjećeno kako je za otpornost na apoptozu od izrazite važnosti okruženje u kojem se stanice nalaze. Kamdje i suradnici (2012) pokazali su da stanice strome koštane srži pridonose otpornosti stanica B-CLL na apoptozu.

Dosadašnja saznanja iznjedrila su nekoliko lijekova koji izravno utječu na modulaciju puta dojavljivanja Notch. Tako je otkriće inhibitora gama sekretazne aktivnosti bilo potaknuto ponajviše istraživanjima na Alzheimerovoj bolesti te kasnije primijenjeno u liječenju različitih oblika zloćudnih oboljenja. Osim inhibitora gama sekretazne aktivnosti dosad je poznat još jedan pokušaj modulacije puta dojavljivanja Notch, putem imunoterapije i razvijanja protutijela usmjerenih na bilo koji od članova puta (118). Povezanost puta dojavljivanja Notch te Aiolosa, kao i ostalih čimbenika unutar obitelji Ikaros (Helios, Eos, Pegasus) u B-CLL-u ostaje nerazjašnjena iako su predmet intenzivnih istraživanja (119, 120).

3 Ispitanici, materijali i metode

3.1 Ispitanici

Skupinu ispitanika činilo je trinaest osoba koje, prema dijagnostičkim kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije, boluju od kronične leukemije limfocita B (eng. B cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL) te šest zdravih ispitanika. Uzorci periferne krvi i koštane srži prikupljeni su u suradnji s Kliničkom bolnicom „Merkur“. Za sve bolesnike napravljena je detaljna dijagnoza na temelju ispoljavanja biljega karakterističnih za kroničnu limfocitnu leukemiju (stanice kojima je istovremeno pokazana prisutnost biljega CD5 i CD19) i pokazatelja stadija progresije bolesti prema Jakšiću i sur. (98) (Tablica 3.1). Za osobe oboljele od kronične limfocitne leukemije B-CLL 6 i B-CLL10 (Tablica 3.1) nisu dostupni klinički podaci, no, uvrstili smo ih u studiju nakon provjere prisutnosti biljega karakterističnih za kroničnu limfocitnu leukemiju. U skupinu zdravih ispitanika uvrstili smo uzorke periferne krvi osoba kojima metodom protočne citometrije nije potvrđena prisutnost zloćudnog $CD5^{+}19^{+}$ klona stanica. Svi uzorci prikupljeni su nakon potpisanih pristanaka, a istraživanja su odobrena i potvrđena pri Etičkom povjerenstvu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 3.1 Dijagnosticirane karakteristike ispitanika oboljelih od kronične leukemije limfocita B.

B-CLL	Dob	Spol	Status	Leukociti x 10^9/L	Limfociti x 10^9/L	Neutrofili x 10^9/L	Hemoglobin g/L	Trombociti x 10^9/L	TTM	BINET	RAI	p53 genske mutacije	13q14.3 delecije	6q21 delecije
1	70	Ž	netr.	124	117	8	141	145	14	B	I	NE	DA	NE
2	69	Ž	netr.	34,36	27,49	4,47	135	200	8	B	I	DA	NE	NE
3	47	M	netr.	97,19	92,33	3,88	138	128	15	B	II	NE	DA	NE
4	48	Ž	netr.	91,22	85,84	3,9	124	131	13	A	II	NE	NE	NE
5	68	Ž	netr.	91,88	80,85	6,43	113	131	13	B	II	NE	NE	NE
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	79	M	netr.	54,72	43,78	5,47	122	284	9	A	I	NE	NE	NE
8	57	Ž	netr.	29,01	25,8	2	134	180	6	A	0	NE	NE	NE
9	47	M	netr.	24,24	18,9	4,8	157	200	6	B	I	DA	NE	NE
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	65	Ž	netr.	41,71	36,87	3,84	134	168	7	A	0	ND	ND	ND
12	67	Ž	netr.	45,64	40,89	3,7	139	163	7	A	0	ND	ND	ND
13	72	M	netr.	39,58	35,07	3,92	150	188	7	A	0	ND	ND	ND

netr. – novootkriveni uzorci osoba koji boluju od B-CLL, nisu prethodno primali nikakvu terapiju
ND – nije definirano
TTM- ukupna masa tumora

3.2 Materijali

3.2.1 Kemikalije

Korištene kemikalije popisane su u Tablici 3.2. Popis korištenih enzima moguće je pronaći u Tablici 3.3. Molekulski biljezi navedeni su u Tablici 3.4.

Tablica 3.2 Popis korištenih kemikalija.

Kemikalija (eng.)	Skraćeni naziv	Proizvođač
Animalne kulture stanica		
Dimethyl-sulfoxide	DMSO	Sigma-Aldrich
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate	PMA	Sigma-Aldrich
All trans retinoic acid	ATRA	Sigma-Aldrich
L-Glutamine	L-GLN	Sigma-Aldrich
Roswell park memorial institute medium	RPMI	Sigma-Aldrich
Minimum essential medium α	α-MEM	Life technologies
Foetal calf serum	FCS	Life technologies
Newborn calf serum	NBCS	Life technologies
Sodium chloride	NaCl	Kemika
Potassium chloride	KCl_2	Kemika
Potassium dihydrogen phosphate	KH_2PO_4	Kemika
Calcium chloride	$CaCl_2$	Kemika
Lymphocyte separation medium	-	Flow laboratories
TrypLE select	-	Life technologies
Lymphocyte separation medium	-	Flow laboratories
Trypan blue	-	Fluka AG
Protočna citometrija		
BD FACSFlow Sheath fluid	-	BD Biosciences
BD FACS Clean Solution	-	BD Biosciences
BD FACSRinse solution	-	BD Biosciences
Dichloro-dihydro-fluorescein acetate	DCFH-DA	Molecular probes
Konfokalna mikroskopija		
Poly-L-lysine solution		Sigma-Aldrich
16% formaldehyde	PFA	Life technologies
Vectashield hard set medium with DAPI		Vectorlabs
Bugačenje po Westernu, imunodetekcija		
SignalFire plus ECL Reagent	-	Cell Signaling
Bovine serum albumine	BSA	Sigma Aldrich
Ammonium persulphate	APS	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIZMA base	Merck
Glycine for electrophoresis		Sigma Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA	Kemika
Tetramethylethylenediamine	TEMED	Sigma-Aldrich
N,N′-Methylenebisacrylamide	-	Sigma Aldrich
Acrylamide	-	Sigma Aldrich
Tween 20	-	Sigma Aldrich
Nonidet-P40	-	Sigma Aldrich
Glicerol	-	Kemika
Nitrocelulozna membrana		Amersham pharmacia biotech

Medical x-ray film	Film za detekciju	Fuji Film
Razvijač		Kodak
Fiksir		Kodak
Test proliferacije stanica		
Cell proliferation reagent WST-1	-	Roche
Izdvajanje RNA		
RNA Bee Isolation solvent	-	Biogenesis
TRIzol reagent	-	Life technologies
Izopropanol	$(CH_3)_2CHOH$	Kemika
Etanol	C_2H_5OH	Kemika
Kloroform	$CHCl_3$	Kemika
Diethylpyrocarbonate	DEPC	Sigma-Aldrich
Obrnuto prepisivanje		
Oligo dT (50 µM)	-	Life technologies (Invitrogen)
Ditiothreitol	DTT	Life technologies (Invitrogen)
5xRT buffer	-	Life technologies (Invitrogen)
10x Taq RT buffer	-	Life technologies (Applied biosystems)
$MgCl_2$ (25mM)	-	Life technologies (Applied biosystems)
dNTP mix (2.5 mM svaki)	-	Life technologies (Applied biosystems)
Random hexamers (50 µM)	-	Life technologies (Applied biosystems)
Priprema vanjskog standarda		
Wizard SV Gel and PCR clean up system kit	-	Promega
PicoGreen dsDNA Quantitation reagent	-	Molecular probes
Picogreen Assay	-	Molecular probes

Tablica 3.3 Popis korištenih enzima.

Kemikalija (eng.)	**Kataloški broj**	**Proizvođač**
Izdvajanje RNA		
Superscript III reverse transcriptase	18080-044	Life technologies (Invitrogen)
RNAse inhibitor (20 U/µl)	N808-0234	Life technologies (Applied biosystems)
RNAse block (40 U/µl)	300152	Agilent technologies
Gold Taq Polymerase	N808-0249	Life technologies (Applied biosystems)
MuLV reverse transcriptase	N808-0018	Life technologies (Applied biosystems)
Multiscribe reverse transcriptase	N808-0234	Life technologies (Applied biosystems)
Protease inhibitor cocktail	P8340	Sigma Aldrich

Tablica 3.4 Popis korištenih molekulskih biljega.

Molekulski biljezi	**Kataloški broj**	**Proizvođač**
Colorplus Prestained protein ladder	P77115	New England biolabs
Marker VIII	11336045001	Roche
100 bp DNA ladder	15628-019	Life technologies (Invitrogen)

Tablica 3.5 Popis protutijela upotrijebljenih tijekom istraživanja.

Protutijelo	Klon/Razrjeđenje	#/ Tvrtka
	Bugačenje po Westernu	
Notch1 XP Rabbit mAb	D1E11/ 1:2000	3608/ Cell Signaling
Cleaved Notch1 Rabbit mAb	D3B8/ 1:500	4147/ Cell signaling
b-actin Rabbit mAb	13E5/ 1:1000	4970/ Cell signaling
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	1: 1000	7074/ Cell signaling
	Protočna citometrija, konfokalna mikroskopija	
Monoclonal Mouse anti-Human CD5 (RPE)	DK23/ 1:30	R0842/ Dako
Monoclonal Mouse anti-Human CD19 (APC)	HD37/ 1:5	C7224/ Dako
Monoclonal Mouse anti-Human CD11b (FITC)	Bear1/1:50	IM0530/Beckman Coulter
Monoclonal Mouse anti- Human CD19 (PE)	HD37/1:10	R0808/Dako
Annexin-V-FLUOS Staining kit	1:200	11858777001/ Roche
Sytox green	1:10000	S7020/ Life technologies

3.2.2 Loze stanica

Korištene loze stanica vidljive su u Tablici 3.6.

Tablica 3.6 Loze stanica korištene prilikom izrade doktorske disertacije.

Loza stanice	Opis	Referenca
	Mijeloidne loze	
NB4	AML FAB M3	(121)
HL-60	AML FAB M2	(122)
U-937	Histiocitni limfom	(123)
NALM-1	CML	(124)
	Limfoidne loze	
MOLT-4	T-ALL	(125)
Jurkat	T-ALL	(126)
	Fibroblasti	
OP9	Transfecirani mišji fibroblasti	(127, 128)
OP9-DL1	Transfecirani mišji fibroblasti	(128, 129)

Lozu stanica NB4 koja je uspostavljena od osobe oboljele od akutne promijelocitne leukemije (APL), koristili smo prilikom ovog istraživanja. Prema razredbovanju FAB (107), radi se o podvrsti M3 AML koju karakterizira translokacija t(15;17) te postojanje fuzijskog gena PML-RARA, koji je rezultat/posljedica navedene translokacije. U odnosu na druge podvrste AML, osobe koje boluju od APL odgovaraju na terapiju potaknutu ATRA.

Loza stanica HL-60, uspostavljena od osobe oboljele od akutne mijeloidne leukemije (AML FAB M2), prvotno se koristi pri ispitivanjima diferencijacije potaknute s DMSO, PMA, ATRA te drugim agensima.

Loza stanica U-937 izvedena je iz zloćudnih stanica pleuralne efuzije 37-godišnje osobe oboljele od histiocitnog limfoma. Moguće je poticanje diferencijacije k odvedenijim oblicima monocitne loze zriobe stanica.

NALM-1 naziv je loze stanica izvedene od trogodišnjeg dječaka oboljelog od kronične mijeloidne leukemije u blastičnoj krizi. Stanice su pozitivne na terminalnu deoksinukleotidil transferazu te posjeduju Philadelphia kromosom t(9;22), tj. fuzijski BCR-ABL 1 gen.

MOLT-4 loza stanica periferne krvi izolirana iz devetnaestogodišnjaka oboljelog od akutne limfoblastične leukemije (ALL). Stanice su okruglastog oblika i rastu u suspenziji, a jedna od bitnijih karakteristika je postojanje mutacija genu za Notch1.

Loza stanica Jurkat izvedena je iz periferne krvi četrnaestogodišnjeg dječaka oboljelog od akutne limfoblastične leukemije. Stanice mogu rasti u nakupinama i pojedinačno, a jedna od osobitosti je konstantna proizvodnja interleukina-2. Primarno se koriste u svrhu određivanja osjetljivosti stanica raka na lijekove i zračenje.

Loza fibroblasta OP9 izvedena je iz žrtvovanih novorođenih miševa soja B6C3F1. Posebnost stanica je da mogu podržavati razvoj i diferencijaciju hematopoetskih stanica matica, uključujući i razvoj limfocita B (130). Stanice OP9 zaražene su s praznim MigR1 retrovirusnim vektorom (49) ili s retrovirusnim vektorom MigR1 napravljenim da eksprimira gen za Delta-like 1(131), dopuštajući istovremenu ekspresiju gena od interesa te zelenog fluorescentnog proteina kao biljega (GFP, eng. green fluorescent protein). Također, pokazano je kako loza stanica OP9 ima slične imunofenotipske karakteristike kao i mišje mezenhimske stanice matica (132).

3.3 Metode

3.3.1 Izdvajanje stanica na gradijentu gustoće

Uzorke koštane srži te periferne krvi izdvajali smo centrifugiranjem na gradijentu gustoće upotrebom medija za odvajanje limfocita (Tablica 3.2), po modificiranom protokolu (133). Uzorke smo razrijedili s otopinom PBS u omjeru 1:1 te smo tako razrijeđene nadslojili na 3 ml medija za odvajanje limfocita u koničnim, 15 ml epruvetama za centrifugiranje. Uzorke smo potom centrifugirali pri 18°C, (900 g, 15 minuta uz isključenu kočnicu centrifuge). Po razdvajanju stanica limfocite smo izdvojili u novu epruvetu. Limfocite smo potom dvaput isprali s otopinom PBS, izbrojali pomoću Neubauerove komorice te ih koristili u daljnjoj manipulaciji.

3.3.2 Brojanje stanica

Brojanje stanica vršili smo pomoću komorice Neubauer koja sadrži urezanu mrežicu definiranog volumena. Mrežica je podijeljena na polja dvaju različitih veličina pri čemu veća polja (N=64) služe za brojanje limfocita, dok se manja polja koriste za brojanje eritrocita. Stanice smo razrijedili i obojali tripanskim modrilom (0,03%), kako bi se razlikovale žive neobojane stanice od obojanih mrtvih. Stanice smo brojali prema formuli:

$$N=N_{64}/V_{64} x\ V_{uzorka} x \text{ razrjeđenje.}$$

Pri čemu je N=ukupan broj stanica; N_{64}=broj izbrojanih stanica u 64 kvadratića; V_{64}=volumen komorice

3.3.3 Zamrzavanje stanica i pohrana

Limfocite izdvojene prethodno opisanim načinom priredili smo u mediju za zamrzavanje stanica (Tablica 3.7) te pohranili u hladnjaku za duboko zamrzavanje pri temperaturi od -80°C.

3.3.4 Kultura animalnih stanica

U istraživanju smo koristili linije navedene u Tablici 3.6. Kako se loze stanica čuvaju u mediju za zamrzavanje stanica pri temperaturi od -80°C, prije upotrebe smo ih otopili te

isprali u 5 ml medija za ispiranje stanica, kako bi uklonili višak medija za zamrzavanje koji sadrži DMSO (Tablica 3.7). Stanice smo potom centrifugirali deset minuta (300 g pri +4°C), uklonili nadtalog te smo postupak ispiranja ponovili još jednom. Po ispiranju, loze stanica prenijeli smo u Petrijeve zdjele ili bočice za uzgoj stanica uz dodavanje prikladnog medija za uzgoj stanica (Tablica 3.7).

Tablica 3.7 Sastav različitih vrsta medija korištenih pri radu s kulturama animalnih stanica.

Medij	**Sastav**
Medij za zamrzavanje stanica	RPMI-1640 : 70% FCS : 20% DMSO : 10%
Medij za zamrzavanje stanica OP9	α-MEM : 40% FCS : 50% DMSO: 10%
Medij za uzgoj stanica	RPMI-1640 : 90% FCS : 10% L-glutamin : 1mM
Medij za uzgoj stanica OP9	α-MEM : 80% FCS : 20% L-glutamin: 1mM
Medij za ispiranje stanica	PBS: 90% NBCS: 10%
Medij za propuštanje stanica	PBS: 98% NBCS: 2%

3.3.5 Protočna citometrija

Metoda analize stanica protočnim citometrom stara je četrdesetak godina i do danas je jedna od osnovnih hematoloških i imunoloških tehnika. Protočni citometar sastoji se od tri međusobno povezana dijela: optičkog, protočnog te elektronskog. Protočni sustav sačinjavaju pokretačka tekućina (eng. sheath fluid), suspenzija stanica te sustav zračnog potiska. Optički dio zadužen je za detekciju svakog događaja laserskom zrakom, nakon čega putem niza zrcala, leća te fotomultiplikatorskih dioda taj događaj bude pojedinačno prikazan u elektronskom obliku. Svaki protočni citometar ima mogućnost praćenja veličine stanica (eng. forward scatter- svjetlost koja se raspršti pod malim kutom) te zrnatosti (eng. side scatter, svjetlost koja se rapršti pod pravim kutom). Osim navedenog, stanice je moguće razvrstati i razlikovati i prema različitim fluorokromima vezanim na određena monoklonska protutijela, koja se koriste za identifikaciju staničnih biljega. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću

emitirat će svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti što će citometar putem posebnih osjetnika i zabilježiti (134). Ovim načinom, ovisno o vrsti uređaja, moguće je razvrstati stanice na temelju prisutnosti i do osamnaest biljega istovremeno, a u novije vrijeme se pojavljuju i naprednije inačice uređaja i metoda poput fotoakustičnog razvrstavača stanica, masene citometrije, koji omogućuju praćenje i do 40 biljega istovremeno (135, 136).

Prilikom istraživanja koristili smo dva instrumenta za protočnu citometriju: protočni razvrstavač stanica FACS Aria, opremljen automatiziranom jedinicom za razvrstavanje pojedinačnih stanica te protočni uređaj za analizu FACS Calibur (Oba Becton Dickinson, SAD). Tijekom razvrstavanja stanica koristili smo računalni program FACS Diva, dok smo prilikom prikupljanja i snimanja događaja protočnim citometrom FACS Calibur koristili pripadujući program za analizu CellQuest (oba Becton Dickinson, SAD). Računalni program FCS Express 3 (De novo software, SAD) koristili smo za obradu dobivenih rezultata.

3.3.6 Kokultivacija i diferencijacija

Za potrebe ciljane diferencijacije koristili smo OP9 sustav (128), pri kojemu smo stanice loze NB4 te HL-60 kultivirali na podlozi s OP9 stanicama ili s OP9-DL1 stanicama. 10^5 stanica OP9/OP9 DL1 nasadili smo početnog (nultog) dana pokusa po svakoj Petrijevoj zdjelici promjera 35mm (Greiner, Njemačka). Nakon inkubacije stanica OP9 te perioda priljepljivanja stanica (inkubacija u trajanju 6 do 18 sati) adheriranim stanicama promjenili smo medij čime smo uklonili mrtve stanice OP9. Potom smo 10^5 stanica leukemijske loze NB4 ili HL-60 resuspendirali u 2 ml medija za uzgoj OP9 stanica (Tablica 3.6) te dodali na adherirane stanice. Za diferencijaciju loza stanica koristili smo reagense ATRA te PMA (Sigma, SAD). Stanice smo uzgajali bez i u prisustvu ATRA (završna koncentracija 1μM) te PMA (završna koncentracija 80ng/ml) jedan do pet dana, bez ili s adheriranim stanicama OP9 (ovisno o vrsti pokusa). Reagens ATRA dodavali smo na dnevnoj osnovi tijekom trajanja eksperimenta, dok smo PMA jednokratno dodali na početku pokusa. Po isteku predviđenog trajanja pokusa stanice smo odlijepili od podloge, upotrebom tripsina ili reagensa Tryple select (Tablica 3.2). Prikupljene stanice dvaput smo isprali u otopini PBS te smo potom uzorke spremili za daljnju analizu. U slučaju pripreme uzoraka za analizu protočnim citometrom, stanice smo nakon dvostrukog ispiranja u PBS-u te uklanjanja nadtaloga nakon centrifugiranja (300 g, 10 minuta, +4°C) obilježavali protutijelom CD11b FITC (Tablica 3.5).

Nakon 20 min inkubacije pri +4°C stanice smo isprali u PBS-u te resuspendirali u primjerenom volumenu PBS-a s dodanim propidij jodidom.

3.3.7 Apoptoza

Za praćenje stupnja apoptoze koristili smo loze stanica (HL-60, NB4) i limfocite izolirane iz šest ispitanika koji boluju od B-CLL. Limfocite B-CLL inkubirali smo u prisustvu jednoslojnih stanica strome transfeciranih s praznim retrovirusnim vektorom (OP9) ili s vektorom koji osim gena reportera GFP ima i ligand DL1. 1-2x10^6 limfocita B-CLL nasadili smo u Petrijeve zdjelice promjera 60 mm bez i u prisustvu OP9 ili OP9-DL1 (1x10^6). Loze stanica smo, uz inkubaciju s OP9-DL1 fibroblastima, ciljano diferencirali s agensima PMA i ATRA te uzgajali 24 sata pri 37°C. Prilikom svih pokusa, stanice smo kultivirali u mediju za uzgoj stanica OP9 (Tablica 3.7). Sve uzorke prilikom istraživanja inkubirali smo pri temperaturi od 4°C ili 37°C. Postotak apoptotskih stanica mjerili smo protočnim citometrom (FACS Calibur, Becton Dickinson). Leukemijske stanice opisali smo na temelju ekspresije površinskih biljega CD5 PE/CD19 APC, dok smo postotak apoptotskih stanica odredili prema ekspresiji biljega Annexin V FITC (veže se na fosfatidil serin koji u ranom stupnju apoptoze postane vidljiv na vanjskoj površini stanične membrane te propidij jodida (ugradbeni agens koji se veže na DNA te se koristi pri razlikovanju živih od mrtvih stanica ili pri analizama staničnog ciklusa metodom protočne citometrije, Tablica 3.5). Obilježavanje stanica vršili smo prema napucima proizvođača (Tablica 3.5). Podatke dobivene protočnom citometrijom analizirali smo koristeći računalni program FCS express 3 (De Novo software, SAD).

3.3.8 Razvrstavanje stanica

Odmrznuli smo uzorke ispitanika, dvaput smo ih isprali u mediju za ispiranje stanica te potom inkubirali s reagensom Sytox green (Life technologies) deset minuta u mračnom prostoru pri sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Potom smo stanice centrifugirali (300 g, pet minuta pri +4°C) te inkubirali s protutijelima (Tablica 3.5) u mračnom prostoru dvadeset minuta pri temperaturi od +4°C. Nakon ispiranja (300 g, 5 minuta pri +4°C), stanice smo priredili u određenom volumenu medija za propuštanje stanica (Tablica 3.7) te smo ih potom razvrstavali i pohranjivali u 5 µl PBS po pojedinom događaju u mikroepruvete (0,2 ml).

Razvrstane pojedinačne stanice pohranili smo pri -80°C, dok smo od ostatka razvrstanih stanica priredili lizat za izolaciju ukupnih molekula RNA.

3.3.9 Mjerenje koncentracije, SDS PAGE, bugačenje po Westernu te imunodetekcija proteina

Priprema staničnog lizata: Izdvojene stanice isprali smo u mediju PBS te smo na talog stanica dodali pufer za lizu stanica (Tablica 3.8) s dodanim inhibitorima proteaza (prema uputama proizvođača, 1 µl mješavine inhibitora dovoljno je za susprezanje proteazne aktivnosti milijun stanica, Tablica 3.3). Na svakih milijun stanica dodali smo 20 µl pufera za lizu stanica s dodanim inhibitorima proteaza.

Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu: Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (137) temelji se na vezanju proteina na boju u otopini (Coomassie Brilliant blue G-250), čime proteini u kiselom okruženju reagensa utječu da protonirani oblik otopine (crvenkaste boje, maksimum apsorbancije pri 465 nm) prijeđe u neprotonirani plavkasti oblik (maksimum apsorbancije pri 610 nm). Razlika između dva oblika boje najveća je pri 595 nm, što je ujedno i valna duljina pri kojoj se određuje koncentracija proteina. Raspon detekcije seže od 50-1000 µg/ml. Sastav reagensa za određivanje koncentracije po Bradfordu vidljiv je u Tablici 3.8.

U svrhu određivanja standardne krivulje, napravili smo seriju razrjeđenja proteina BSA (eng. bovine serum albumine) u rasponu 0,5-8 µg/µl. Potom smo na ploču s 96 bunarića nanijeli triplikate uzoraka za mjerenje u tri različita razrjeđenja (4x, 8x te 16x) te pomiješali s 200 µl pripremljenog reagensa. Koncentraciju proteina izmjerili smo pomoću automatskog čitača vrijednosti apsorbancija.

Elektroforeza SDS PAGE, bugačenje po Westernu: Po izmjerenoj koncentraciji denaturirali smo proteine pri povišenoj temperaturi (5 minuta, 95°C) te potom normalizirane koncentracije proteina (~45µg) nanijeli u prethodno pripremljen SDS-PAGE gel (Tablica 3.8). Tijek elektroforeze (150 V, 10 min; 180 V, 100 min) pratili smo uz pomoć prethodno obojanog molekulskog biljega (Tablica 3.4). Po završetku elektroforeze (Hoefer Mighty small system), vršili smo bugačenje proteina na nitroceluloznu membranu (GE Healthcare) pomoću

sustava za prijenos proteina tvrtke BioRad (1500 mA preko noći, konstantna jakost struje, +4°C).

Imunodetekcija: Nitroceluloznu membranu inkubirali smo u TBS-T + 5% BSA (šest sati, +4°C, 40 rpm, valovito zibanje) u svrhu smanjenja nespecifičnog vezanja. Potom smo odlili otopinu za blokiranje te smo membranu preko noći inkubirali u pripremljenoj otopini primarnog protutijela, pri +4°C uz valovito zibanje od 40 rpm. Membranu smo isprali (3x5 minuta) u TBS-T + 5% BSA te smo inkubirali u otopini sekundarnog protutijela (jedan sat, valovito zibanje, 40 rpm). Razrjeđenja protutijela vidljiva su u Tablici 3.5. Nakon četiri serije po deset minuta ispiranja u TBS-T, prisutnost proteina smo detetktirali korištenjem sustava za imunodetekciju Signalfire (Tablica 3.2) (138).

Tablica 3.8 Puferi korišteni prilikom elektroforeze SDS-PAGE te bugačenja po Westernu.

Naziv otopine	**Sastav/ Referenca**
Bradfordov reagens	Coomassie brilliant blue G-250: 10 mg 95% etanol: 5 ml Fosforna kiselina: 10 ml Redestilirana voda do 100 ml
Pufer za prijenos proteina na membranu	25 mM Tris 192 mM glicin 20 % metanol Redestilirana voda do 1000 ml
Pufer za SDS-PAGE (10X)	Tris: 30,3 g Glicin: 144 g SDS: 10 g Redestilirana voda do 1000 ml
Izmjenjeni Carin pufer za lizu stanica	Tris/HCl (pH 7,4): 20 mM NaCl: 137 mM EDTA: 2 mM NP40: 1% Glicerol: 10% Inhibitori proteaza
Pufer za skidanje proteina s membrane	Glicin: 0,2 M Tween 20: 0,05%
Pufer za nanošenje uzoraka na gel (6x)	Tris: 1,875 ml SDS: 0,6 g 100 % glicerol: 4,8 ml 2-Betamerkaptoetanol (14,7 M): 0,9 ml Bromfenolno plavilo: 3 mg Redestilirana voda do 10 ml
Tris-Buffered saline Tween 20 (TBS-T)	Tris: 2,42 g NaCl: 8,77 g Tween 20: 0,01% Redestilirana voda do 10 ml
10% SDS-PAGE-gel za razdvajanje	Redestilirana voda: 2,95 ml Akrilamid/bisakrilamid (29:1): 2,5 ml Tris-HCl (pH 8,8): 1,9 ml 10% SDS: 75 µl 10% APS:75 µl TEMED: 15 µl
10% SDS-PAGE- gel za sabijanje	Redestilirana voda: 4,1 ml Akrilamid/bisakrilamid (29:1): 1 ml Tris-HCl (pH 8,8): 750 µl 10% SDS: 60 µl 10% APS: 60 µl TEMED : 15 µl

3.3.10 Izdvajanje ukupne RNA

Stanice uzoraka (do $5x10^6$) dvaput smo isprali u otopini PBS, centrifugirali (500 g, +4°C, sedam minuta) te na talog stanica dodali 500 µl reagensa TRIZOL ili RNA BEE (Tablica 3.2). Navedena metoda izolacije RNA poboljšana je inačica protokola razvijenog od strane Chomczynski i sur. (139). Uzorak smo inkubirali pri sobnoj temperaturi pet minuta te mu potom dodali 100 µl kloroforma uz blago miješanje. Centrifugiranjem pri 12000 g (15 minuta, +4°C) odvojili smo gornju (vodenu) te donju (organsku) faza. Vodenu fazu prebacili smo u novu epruvetu te dodali 250 µl izopropanola kako bi se izdvojena RNA mogla lakše istaložiti. Pomiješanu vodenu fazu s izopropanolom inkubirali smo pri sobnoj temperaturi deset minuta te smo potom uzorak centrifugirali pri 12000 g (10 minuta, +4°C), uklonili nadtalog te talog dvaput isprali u otopini etanola (75%). Nadtalog smo uklonili, a na talog RNA dodali 15 µl vode obrađene s DEPC te smo pomoću spektrofotometra (Biospec Shimadzu) izmjerili koncentraciju dobivene RNA.

3.3.11 Obrnuto prepisivanje enzimom Superscript III

Reakcija reverzne transkripcije zasniva se na svojstvu molekula RNA da pri određenim uvjetima vežu komplementarne slijedove koji mogu poslužiti kao početnice u reakciji sinteze novog lanca, kataliziranoj enzimom reverzne transkriptaze. Rezultat navedene reakcije nastajanje je komplementarnog lanca DNA (cDNA).

Uvjeti: 1 µl oligo dT (50 µM), dNTP (10 mM), 9 µl DEPC H_2O te 2 µl RNA (500ng/µl). Pri temperaturi od 65º C pet minuta se odvija denaturacija. Potom smo dodali 4 µl 5x pufera te 2 µl DTT (0,1 M). Pri ovom koraku protresli smo epruvetu na tresilici te ju kratko centrifugirali u svrhu homogenizacije uzorka te postavili u uređaj za PCR pri temperaturi od 42º C. Nakon dvije minute dodali smo 0,7 µl reverzne transkriptaze Superscript III (Invitrogen- Life technologies). Uzorak smo inkubirali 50 minuta pri 42º C. Nakon završetka reakcije uzorak smo stavili na led, te razrjedili s 20 µl vode obrađene s DEPC do konačnog volumena od 40 µl.

3.3.12 Lančana reakcija polimerazom

Pojedinačne lančane reakcije polimerazom radili smo prema sljedećem protokolu: 2µl $MgCl_2$ (25mM), 0,5 µl dNTP (10 mM), 2,5 µl 10x pufer II, 15,8 µl H_2O, 2 µl cDNA, 1 µl početnica 1 (5 µM), 1 µl početnica 2 (5µM), te 0,2 µl Taq polimeraze. Uvjeti pri kojima smo radili lančane reakcije polimerazom prikazani su u Tablici 3.9.

Tablica 3.9 Uvjeti umnažanja odsječaka pojedinačnih gena tijekom lančane reakcije polimerazom.

Temperatura	**Vrijeme**	**Broj ciklusa**
Lančana reakcija polimerazom		
95°C	10 minuta	**-**
94°C	30 sekundi	35
60°C	30 sekundi	
72°C	60 sekundi	
72°C	**10 minuta**	**-**

3.3.13 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Taqman metoda)

Načelo lančane reakcije polimerazom pomoću metode Taqman oslanja se na 5'-3' egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze koja ima sposobnost cijepanja dvostruko obilježenih proba tijekom postupka hibridizacije. Početnice za Taqman sastoje se od kovalentno pričvršćenog fluorofora na 5' kraj početnice, te utišivača signala na 3' kraju. Dok su fluorofor i utišavač u svojim nativnim pozicijama, ne dolazi do emitiranja fluorescencije uslijed pojave rezonancijskog prijenosa fluorescentne energije (eng. fluorescence resonance energy transfer, FRET). Po ugradbi početnica tijekom lančane reakcije polimerazom, a uslijed polimerazne egzonukleazne aktivnosti, dolazi do otpuštanja fluorofora iz blizine utišivača, te je signal dobiven Taqman metodom proporcionalan pokazatelj koliko se fluorofora oslobodilo tj. koliko se početnica ugradilo u nastale odsječke molekula DNA u određenoj reakciji.

Sve pokuse radili smo s reagensom Taqman Gene expression Mastermix (Applied biosystems). Za metodu Taqman napravili smo cDNA po naputku proizvođača, pri čemu je najbitnija stavka reverzna transkriptaza MultiScribe, koja je posebno prilagođena za pokuse temeljene na metodi Taqman. Sastav reakcijske smjese pri izradi cDNA vidljiv je u Tablici 3.10.

Prvotno smo pripremili te pomiješali sve neenzimske komponente, koje smo potom protreskali pomoću električne tresilice. Potom smo dodali enzimske komponente (Multiscribe RT te inhibitore RNAza) te smo na kraju dodali uzorak RNA. Dodane komponente blago smo promiješali ručnim okretanjem zatvorene epruvetice. Reakcija se odvija pri uvjetima prikazanim u Tablici 3.11.

Tablica 3.10 Sastav reakcije pri obrnutom prepisivanju (metoda Taqman).

Sastojak	**Volumen**
H_20	9,25 µl
10x Taq RT buffer	5 µl
$MgCl_2$ (25mM)	11 µl (završna koncentracija: 5,5 mM)
dNTP mix (2,5 mM svaki)	10 µl (završna koncentracija: 0,5 mM)
Random hexamers (50 µM)	2,5 µl (završna koncentracija: 2,5 µM)
MultiScribe RT (50 U/µl)	1,25 µl
RNAse inhibitors (20 U/µl)	1 µl
RNA	10 µl
Ukupni volumen	**50 µl**

Tablica 3.11 Uvjeti pri kojima se odvijaju reakcije temeljene na kvantitativnoj metodi Taqman.

Temperatura	**Vrijeme**	**Broj ciklusa**
Obrnuto prepisivanje		
25°C	10 minuta	1
37°C	120 minuta	1
4°C	∞	-
Lančana reakcija polimerazom-Taqman		
50°C	2 minute	1
95°C	10 minuta	1
95°C	15 sekundi	40
60°C	60 sekundi	

Nakon dobivanja komplementarne DNA, uzorak smo deset puta razrijedili s vodom prije stavljanja u reakciju lančane reakcije polimerazom (Tablica 3.12).

Tablica 3.12 Smjesa za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu metodom Taqman. Prikazana je reakcijska mješavina za jedan uzorak.

Sastojak	Volumen
H_20	11,9 µl
20x Assay	1,7 µl
2x Taqman	17
cDNA	3,4 µl
Ukupni volumen	**34 µl**

Prilikom pripreme i po dodavanju svih komponenti od iznimne je važnosti sve uzorke dobro promiješati uz pomoć tresilice te potom kratko centrifugirati i oboriti uzorak. Svaki uzorak razdijelili smo na tri optičke epruvetice (10 µl/epruvetici), namijenjene isključivo za reakcije lančanom polimerazom u stvarnom vremenu (Applied biosystems). Reakcija se odvijala pri uvjetima prikazanim u Tablici 3.12. Za reakcije lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu metodom Taqman koristili smo sustav 7300 real time PCR system, dok smo prikupljanje podataka u stvarnom vremenu vršili pri 60°C, 60 sekundi.

Početnice korištene pri kvantitativnoj lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu prikazane su u Tablici 3.13.

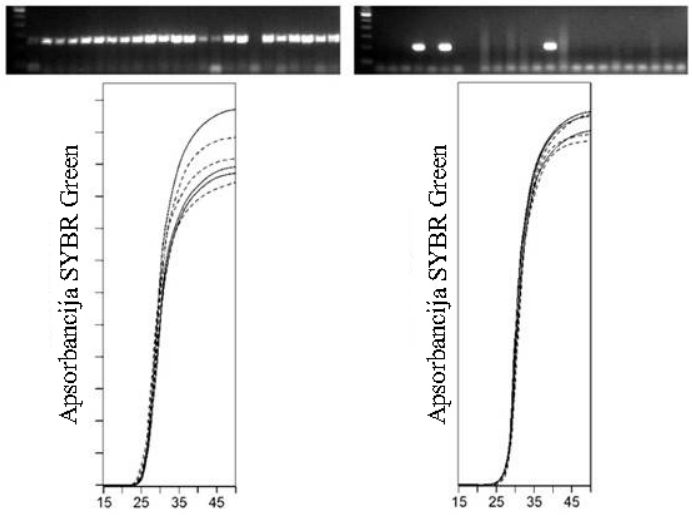
Tablica 3.13 Komercijalno dostupne početnice za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu metodom Taqman.

Ime početnice	Kataloški broj
18S	Hs999901-s1
MRPL19	Hs00608519_m1
Notch1	Hs00413187_m1

3.3.14 Višestruko umnažanje lančanom reakcijom polimerazom

Višestruka lančana reakcija polimerazom (eng. Multiplex polymerase chain reaction, mxPCR) izmijenjena je metoda lančane reakcije polimerazom pri kojoj se istovremeno koristi više parova početnica za umnažanje odsječaka gena od interesa. Prilikom izvedbe mxPCR, potrebno je paziti na optimizaciju uvjeta te pomno birati korištene početnice, kako bi se izbjegla pojava dimerizacije među početnicama i drugih nejedinstvenih odsječaka. Osim samog slijeda, bitna je i koncentracija svake od početnica koje moraju biti usklađene. Za umnažanje odsječaka komplementarne DNA (cDNA) koristi se djelomično ugnježđeni sustav lančane reakcije polimerazom, čija je prednost veća osjetljivost i jedinstvenost metode. Metoda se temelji na primjeni dvije uzastopne reakcije PCR, nakon ciljanog postupka obrnutog prepisivanja. Cilj prve reakcije je umnažanje jedinstvenog dijela odsječka iz male početne koncentracije cDNA, dok je cilj druge reakcije povećati jedinstvenost unutar umnoženog odsječka putem promjene početnice koja se veže u pravom smjeru. Početnica koja se veže u obrnutom smjeru ostaje nepromjenjena.

Istraživanja rađena na većem broju stanica mješovite populacije, kojima je fenotip neodređen, često mogu biti neprikladna s obzirom na činjenicu kako na razini glasničke RNA nekoliko stanica s prekomjerno eksprimiranim genom od interesa može dati isti ili čak i jači signal kao i mnoštvo stanica s nižom razinom ekspresije određenog gena (Slika 3.1). Pri slučaju istovremenog istraživanja većeg broja stanica rezultat nije dovoljno osjetljiv, tj. ne pruža dovoljno informacija o uzorku, dok je u slučaju analize na pojedinačnoj stanici moguće utvrditi postotak pozitivnih stanica za proučavani gen od interesa te je moguće odrediti i apsolutni broj kopija molekula po određenoj stanici. Time se dobiva preciznija i učinkovitija slika ekspresije za određeni uzorak na razini glasničke RNA.



Slika 3.1 Hipotetski primjer istraživanja pri kojem veliki broj stanica ima nižu razinu ekspresije (lijevo) te istraživanja u kojem nekoliko stanica s višom razinom ekspresije gena od interesa daju sličan signal prilikom kvantitativnog mjerenja lančanom reakcijom polimerazom (desno).

Odabir i oblikovanje početnica: Korištene početnice pomno smo odabrali te smo ih izradili po izričito propisanim pravilima (140). Ukratko, odabrane početnice su duljine 20 parova baza, s istom učestalošću parova nukleotida A-T i G-C. Duljina očekivanih odsječaka prve lančane reakcije polimerazom ne bi smjela premašivati 360 parova baza, dok se duljina odsječaka druge lančane reakcije polimerazom obično kreće oko 200 do 250 parova baza. Nespecifičnost vezanja početnica provjerili smo pomoću besplatno dostupnog računalnog programa Amplify 3.0 (141), dok smo jedinstvenost vezanja na ljudski slijed provjerili pomoću programa Primer blast (142). Sve početnice s otkrivenim jakim nejedinstvenim vezanjem izbacili smo iz istraživanja. Također, sve sljedove početnica izradili smo na način da prelaze granice egzona i introna te na taj način spriječe umnažanje genomske DNA. Popis korištenih početnica vidljiv je u sklopu Tablice 3.14.

Tablica 3.14 Popis korištenih početnica.

Nukleotidni slijed	Gen (oznaka početnice)	Duljina odsječka*
	Ikaros	
gacatgtcccaagtttcagg	Ikaros 1F	243 pb
aagcgatactccagatgagg	Ikaros 2F	205 pb
cgaggcatcaagcattcgta	Ikaros 1R	
	Helios	
gacaatgagctttcacccga	Helios 1F	234 pb
ggagcactccaatatggcaa	Helios 2F	211 pb
cacctcgctgctctcaatta	Helios 1R	
	Aiolos	
tgcggaactgaaaagcactc	Aiolos 1F	358 pb
aaaagcactcaggagcagtc	Aiolos 2Fb	348 pb
ggataatccacacacatcgc	Aiolos 1Rb	
	Eos	
catctctggagaaggagttc	Eos 1F	326 pb
tcagtgccaactccatcaag	Eos 2F	239 pb
cacgttgggtccaatacaga	Eos 1R	
	Pegasus	
aaccagagcctttggacttc	Pegasus 1F	315 pb
agctggaacagatggtgatc	Pegasus 2F	197 pb
gaggtttttcacctgtgtgg	Pegasus 1R	
	Notch1	
aagacatgaccagtggctac	Notch 1F	251 pb
aacatcaacgagtgtgcgtc	Notch 2F	186 pb
gctctcatagtcctcggatt	Notch 1R	
	Deltex1	
cttgtgccctacatcatcga	Deltex1 1F	250 pb
tgcagtccatgcaccagttt	Deltex1 2F	228 pb
agatgaggtagcagaagcct	Deltex1 1R	
	Hes1	
cgacaccggataaaccaaag	Hes 1F	344 pb
gcatctgagcacagaaagtc	Hes 2F	321 pb
agtgcgcacctcggtattaa	Hes 1R	
	CD3e	
ggttattatgtctgctaccc	CD3e A	347 pb
tggagatggatgtgatgtcg	CD3e C	259 bp
ggtcagatgcgtctctgatt	CD3e B	
	HPRT	
gtcttgctcgagatgtgatg	HPRT1 1F	346 pb
ttgctgacctgctggattac	HPRT1 2F	265 pb
aagcttgcgaccttgaccat	HPRT1 1R	

*duljina odsječaka izražena u parovima baza početnica 1F ili 2F u kombinaciji s 1R

Obrnuto prepisivanje i višestruke lančane reakcije polimerazom: Prilikom istraživanja koristili smo istovremeno obrnuto prepisivanje za osam gena. Sastav reakcijske smjese prikazan je u Tablici 3.15., prve lančane reakcije polimerazom u Tablici 3.16 te druge lančane reakcije polimerazom u Tablici 3.17.

Tablica 3.15 Sastav reakcijske smjese pri obrnutom prepisivanju.

Sastojak	**Volumen**
$MgCl_2$ (25mM)	2 µl (završna koncentracija 3,33 mM)
10x PCR buffer 2	1,5 µl
dNTP (10mM svaki)	1,5 µl (završna koncentracija: 1mM)
RNAse block (40U/ µl)	1 µl
MMLV reverse transcriptase	0,7 µl
Početnica 1R (25 µM svaka)	0,08 µl (završna koncentracija: 0,130 µM)
Uzorak	5 µl
Voda obrađena s DEPC	Nadopuniti do ukupnog volumena od 15 µl
Ukupni volumen	**15 µl**

Tablica 3.16 Prva lančana reakcija polimerazom. Prikazane vrijednosti odnose se na jednu reakcijsku smjesu pri kojoj je istovremeno korišteno osam gena.

Sastojak	**Volumen**
$MgCl_2$ (25mM)	7 µl (završna koncentracija: 2mM)
10x PCR buffer 2	8,5 µl
dNTP (2.5 mM svaki)	7 µl (završna koncentracija: 0,2mM)
Početnica 1F (25 µM svaka)	0,05 µl (završna koncentracija 0,015 µM)
Početnica 1R (25 µM svaka)	0,05 µl (završna koncentracija 0,015 µM)
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,6 µl
Voda	46,1 µl
Produkt obrnutog prepisivanja	15 µl
Ukupni volumen	**85 µl**

Tablica 3.17 Druga lančana reakcija polimerazom. Prikazana je jedna reakcijska smjesa pri kojoj je istovremeno korišten jedan par početnica za svaki od gena.

Sastojak	**Volumen (µl)**
$MgCl_2$ (25mM)	1,6 µl (završna koncentracija: 2 mM)
10x PCR buffer 2	2 µl
dNTP (2.5 mM svaki)	2 µl (završna koncentracija: 0,25 mM)
Početnica 2F (25 µM svaka)	0,2 µl (završna koncentracija: 0,25 µM)
Početnica 1R (25 µM svaka)	0,2 µl (završna koncentracija: 0,25 µM)
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,1 µl
Voda	11,9 µl
Produkt prve reakcije PCR	2 µl
Ukupni volumen	**20 µl**

Uvjeti pri kojima se odvijaju reakcije prikazani su u Tablici 3.18.

Tablica 3.18 Uvjeti reakcija prilikom istovremenih višestrukih lančanih reakcija polimerazom.

Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Obrnuto prepisivanje		
37°C	60 minuta	-
95°C	3 minute	-
10°C	∞	-
Prva lančana reakcija polimerazom		
95°C	10 minuta	-
94°C	45 sekundi	15
60°C	60 sekundi	
72°C	90 sekundi	
72°C	10 minuta	-
Druga lančana reakcija polimerazom		
95°C	10 minuta	-
94°C	30 sekundi	2
70°C	45 sekundi	
72°C	60 sekundi	
94°C	30 sekundi	2
66°C	45 sekundi	
72°C	60 sekundi	
94°C	30 sekundi	2
62°C	45 sekundi	
72°C	60 sekundi	
94°C	30 sekundi	48
60°C	45 sekundi	
72°C	60 sekundi	
72°C	10 minuta	-

Izrada standarda: prilikom kvantifikacije ekspresije odsječaka gena na razini glasničke RNA dobivene višestrukim lančanim reakcijama polimerazom, korišten je naputak razvijen od strane Monteiro i sur. (143). Za ukupnu kvantifikaciju molekula Notch1 koristili smo vanjski standard tj. uzorak poznate koncentracije i volumena s točno određenim brojem molekula, koji smo analizirali odvojeno od nepoznata uzorka, no pod jednakim uvjetima. Uzorak ljudske komplementarne DNA umnožen je koristeći jedinstvene početnice za umnaženje odsječka gena za biljeg CD3e. Dobiveni odsječak nanešen je na agarozni gel koncentracije 1% te su jedinstveni odsječci pročišćeni koristeći Wizard SV Gel and PCR clean up system kit (Promega, SAD). Primjenom reagensa Picogreen assay (Molecular

probes, SAD) dobiveni odsječci su kvantificirani te je apsorbancija mjerena na uređaju ABI Prism 7900 HT Sequence detection system (Applied biosystems, SAD). Koncentracija pročišćenih odsječaka DNA izmjerena je uz pomoć reagensa PicoGreen dsDNA Quantitation reagent (Molecular probes, SAD). Standard je definiran mjerenjem četiri koncentracije svakog pojedinog uzorka.

Kvantitativno određivanje apsolutnog broja molekula glasničke RNA: Sastav reakcijske smjese lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. quantitative real time polymerase chain reaction, qRT PCR) prikazan je u Tablici 3.19.

ABI Prism 7900 Sequence detection system koristili smo u svrhu praćenja ekspresije glasničke RNA za gen Notch1. U svrhu provjere nespecifičnog vezanja, napravili smo krivulju denaturacije (15 sekundi pri 95°C; 15 sekundi pri 60°C te 15 sekundi pri 95°C) na kraju svake reakcije (Tablica 3.20). Vrijednost graničnog ciklusa (eng. Ct- threshold cycle) bila je nepromijenjena u svim pokusima, a iznosila je $C_{threshold}$= 0,25.

Tablica 3.19 Reakcijska smjesa lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu prilikom određivanja apsolutnog broja molekula glasničke RNA.

Sastojak	**Volumen (µl)**
2xSYBR Green Master mix	12 µl
Produkt prve lančane reakcije polimerazom	4 µl
Početnica 2F (25 µM)	0,24 µl
Početnica 1R (25 µM)	0,24 µl
Voda	7,52 µl
Ukupni volumen	**24 µl**

Tablica 3.20 Uvjeti pri kojima se odvija lančana reakcija polimerazom prilikom određivanja apsolutnog broja molekula glasničke RNA.

Druga lančana reakcija polimerazom		
95°C	10 minuta	-
95°C	30 sekundi	48
60°C	30 sekundi	
95°C	15 sekundi	
60°C	15 sekundi	
95°C	15 sekundi	

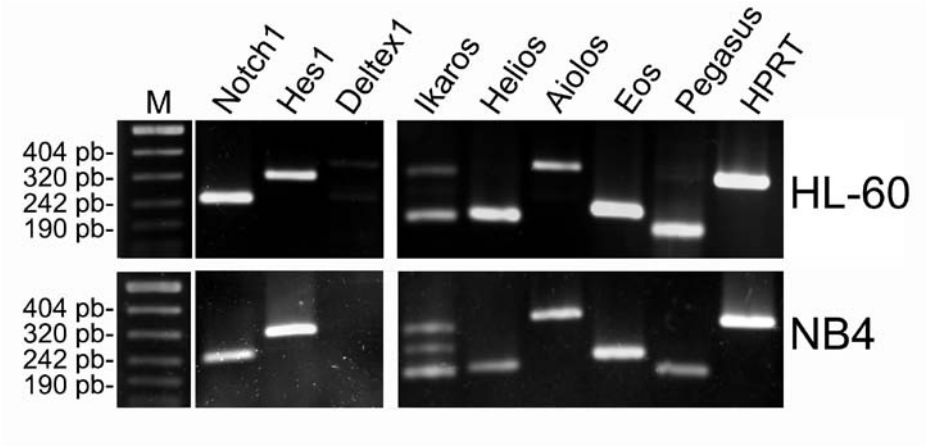
3.3.15 Statistička analiza

Prilikom statističke analize podataka doktorske disertacije i dokazivanja statističke značajnosti koristili smo neparametrijski test Mann Whitney s pragom značajnosti $p<0,05$.

4 Rezultati

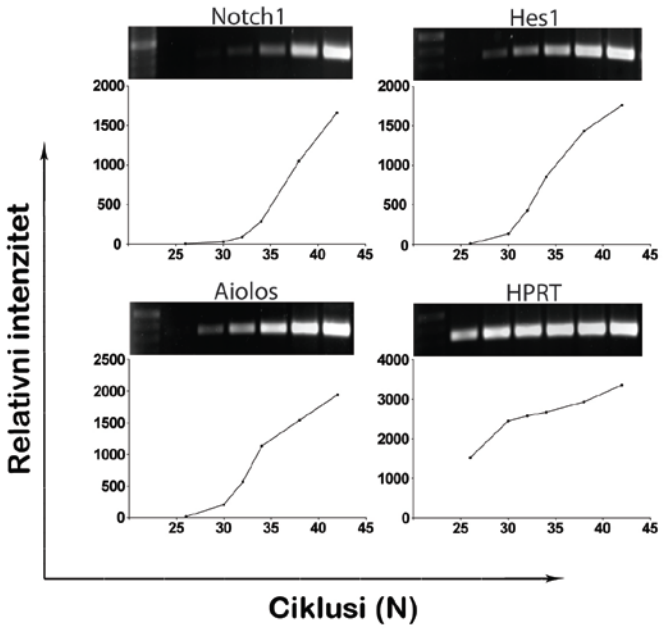
4.1 Kinetika ekspresije gena iz obitelji Ikaros i Notch tijekom diferencijacije hematopetskih stanica

Ispitali smo ekspresiju transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch na razini glasničke RNA. Prethodno izrađene početnice napravili smo na način da optimalno rade izvrgnute istim uvjetima. Ovim pokusom pokazali smo kako su svi ispitani geni prisutni u lozama stanica HL-60 te NB4, s izuzetkom Deltex1 kod loze stanica NB4.



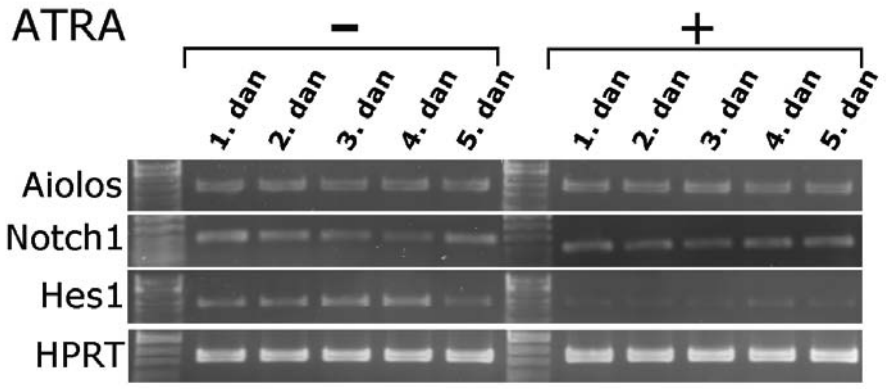
Slika 4.1 Semikvantitativna analiza lančanom reakcijom polimerazom transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch u lozama stanica HL-60 te NB4. 40 µl komplementarne DNA dobili smo iz 1µg RNA te smo za provjeru ekspresije pojedinačnog gena koristili 2 µl dobivene cDNA.

S obzirom na nedovoljnu osjetljivost RT-PCR-a, za neke gene smo napravili dodatne pokuse. Krivulje zasićenja reakcije vidljive su na Slici 4.2. Kako reakciju treba pratiti u stupnju nezasićenosti, odlučili smo kako će se reakcije PCR zaustavljati nakon 34 ciklusa umnažanja. Tijekom lančane reakcije polimerazom mijenjali smo broj ciklusa kako bi odredili optimalan broj ciklusa pri kojem je krivulja nastalih odsječaka u eksponencijalnoj fazi rasta.



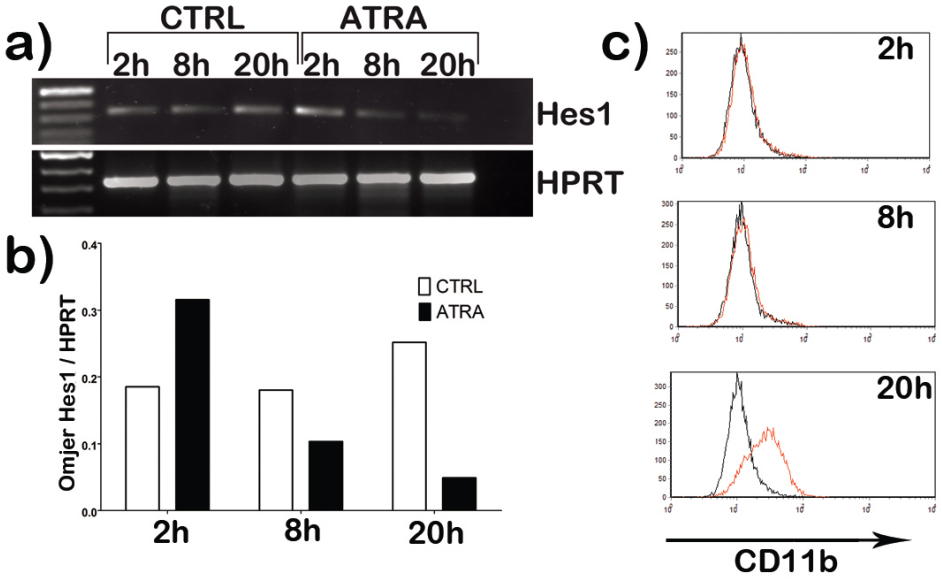
Slika 4.2 Semikvantitativna analiza ekspresije gena za Notch1, Hes1, Aiolos te HPRT na lozi stanica NB4.

Napravili smo i dodatne pokuse ciljanog diferenciranja s ATRA na mijeloidnoj lozi stanica NB4. Pokazali smo kako se na razini glasničke RNA ekspresija gena za Aiolos te Notch1, ne mijenja, dok je razina Hes1 značajno smanjena nakon stimulacije s ATRA (Slika 4.3). Prvotno mjerenje razine ekspresije pratili smo pet dana, s tim da je već nakon prvog dana Hes1 značajno došlo do smanjenja u odnosu na nediferencirane stanice. Niska razina Hes1 ostala je postojanom tijekom svih pet dana pokusa.



Slika 4.3 Ekspresija glasničke RNA za Aiolos, Notch1, Hes1 nakon pet dana izlaganja loze stanica NB4 s retinoičnom kiselinom (završna konc. 1μM). Stalno eksprimirani gen za HPRT koristili smo za normalizaciju ekspresije prikazanih gena.

Prvotno smo utvrdili kako se ekspresija Hes1 na razini glasničke RNA mijenja u procesu diferencijacije mijeloidnih stanica te smo potom pratili kinetiku ekspresije Hes1 tj. dolazi li do smanjenja razine Hes1 na početku postupka diferencijacije potaknutog s ATRA, ili tek u kasnijem stupnju i pojavi CD11b. Slika 4.4. prikazuje kinetiku ekspresije gena od interesa. Na razini glasničke RNA ekspresija Hes1 značajno se smanjuje već nakon osam sati stimulacije vođene s ATRA, dok se unutar dvadeset sati razina Hes1 mRNA svodi na minimum. Pojavu CD11b zabilježili smo po isteku dvadeset sati.

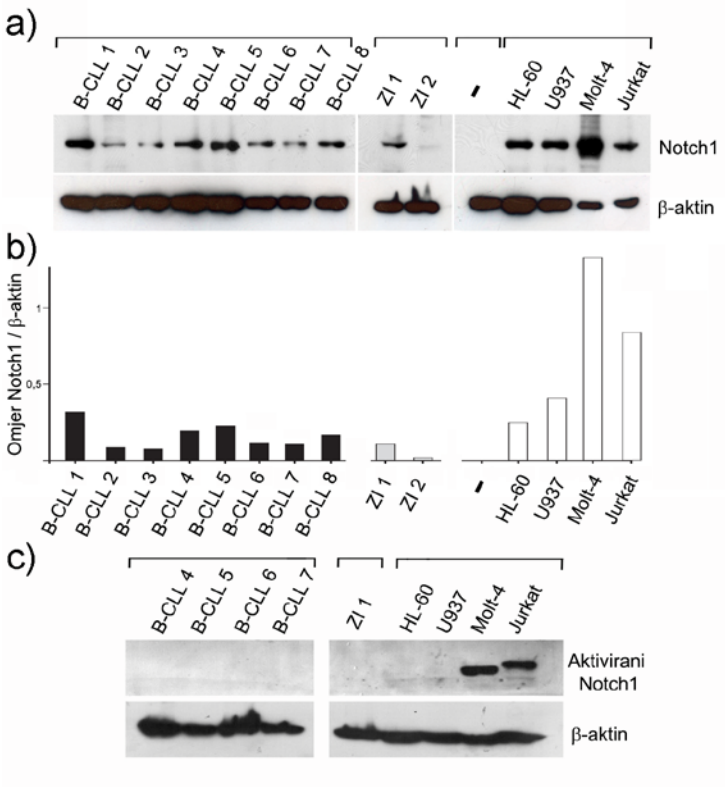


Slika 4.4 Kinetika ekspresije glasničke RNA gena Hes1. (a) Semikvantitaivna lančana reakcija polimerazom te (b) relativni omjer odsječka gena Hes1 u odnosu na ekspresiju HPRT, dobiven denzitometrijskim mjerenjem nakon dva, osam te dvadeset sati inkubacije loze stanica NB4, bez ili u prisustvu ATRA. Denzitometrijsku analizu napravili smo uz pomoć računalnog programa Genetools (Syngene, Velika Britanija). (c) Ekspresija CD11b kod NB4 stanica nakon dva, osam te dvadeset sati inkubacije stanica, bez ili u prisustvu ATRA.

4.2 Postupak dokazivanja ekspresije Notch1 kod osoba oboljelih od B-CLL

Kako bi dokazali ekspresiju transkripcijskog čimbenika Notch1 na razini proteina, učinili smo analizu te imunosno dokazivanje traženog proteina bugačenjem po Westernu (Slika 4.5). 45 µg lizata stanica dobivenih od osoba oboljelih od kronične leukemije limfocita B (B-CLL 1-8), zdravih ispitanika (ZI1-2) te leukemijskih loza stanica podvrgnuli smo elektroforezi. Uzorak akutne mijeloidne leukemije koristili smo kao negativnu kontrolu. Uzorak B-CLL1 odnosi se na proteine iz limfocita periferne krvi, dok su B-CLL2-8 proteini limfocita iz koštane srži. Slika 4.5a prikazuje razinu ekspresije analiziranih uzoraka osoba oboljelih od B-CLL, kao i zdravih ispitanika te loza stanica. Za usporedbu te normalizaciju razine ekspresije koristili smo protutijelo na beta aktin, koji je konstitutivno eksprimirani protein, te smo razinu ekspresije ukupnog Notch1 uspoređivali s razinom ekspresije

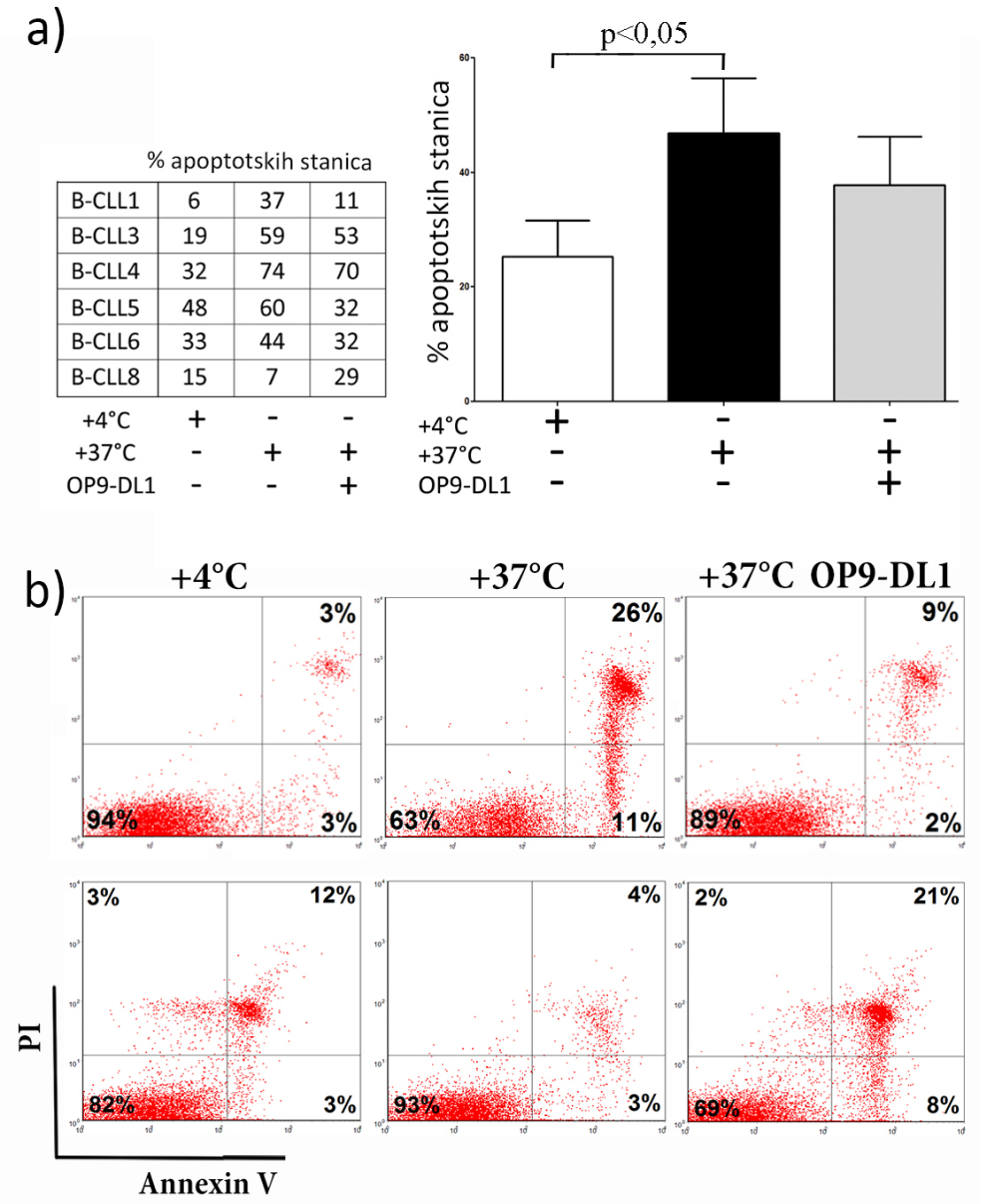
navedenog proteina (Slika 4.5b). Povećana razina ekspresije Notcha u odnosu na razinu ekspresije beta-aktina uočili smo jedino kod loze stanica MOLT-4 (akutna leukemija limfocita T, Tablica 3.6). Slika 4.5c prikazuje kako s protutijelom na aktivirani Notch-1 kod istih uzoraka kao na Slici 4.5a nismo utvrdili ekspresiju aktiviranog proteina Notch1. Ekspresija aktiviranog oblika Notch1 u lizatima loza stanica MOLT-4 te Jurkat poslužila nam je kao pozitivna kontrola prilikom istraživanja.



Slika 4.5 (a) Ekspresija ukupnog proteina Notch1 bugačenjem po Westernu kod uzoraka osoba oboljelih od B-CLL (1-8), AML (-), uzoraka proteina iz limfocita periferne krvi zdravih ispitanika (ZI1-2) te loza stanica leukemija. Podjednaku koncentraciju lizata stanica nanosili smo na gel (~45 µg). Uzorak B-CLL1 te uzorci zdravih ispitanika (ZI1-2) izolirani su iz periferne krvi, dok su ostali uzorci dobiveni izolacijom limfocita iz koštane srži. Loze stanica HL-60, U937, MOLT-4 te Jurkat koristili smo kao pozitivnu kontrolu, a uzorak osobe oboljele od AML (-) kao negativnu kontrolu. Koristili smo protutijela na Notch1 (gornji red) te protutijelo na β-aktin (donji red). (b) Denzitometrijska analiza omjera Notch1 u odnosu na β-aktin. (c) Razina ekspresije aktiviranog unutarstaničnog oblika proteina Notch1 kod navedenih uzoraka.

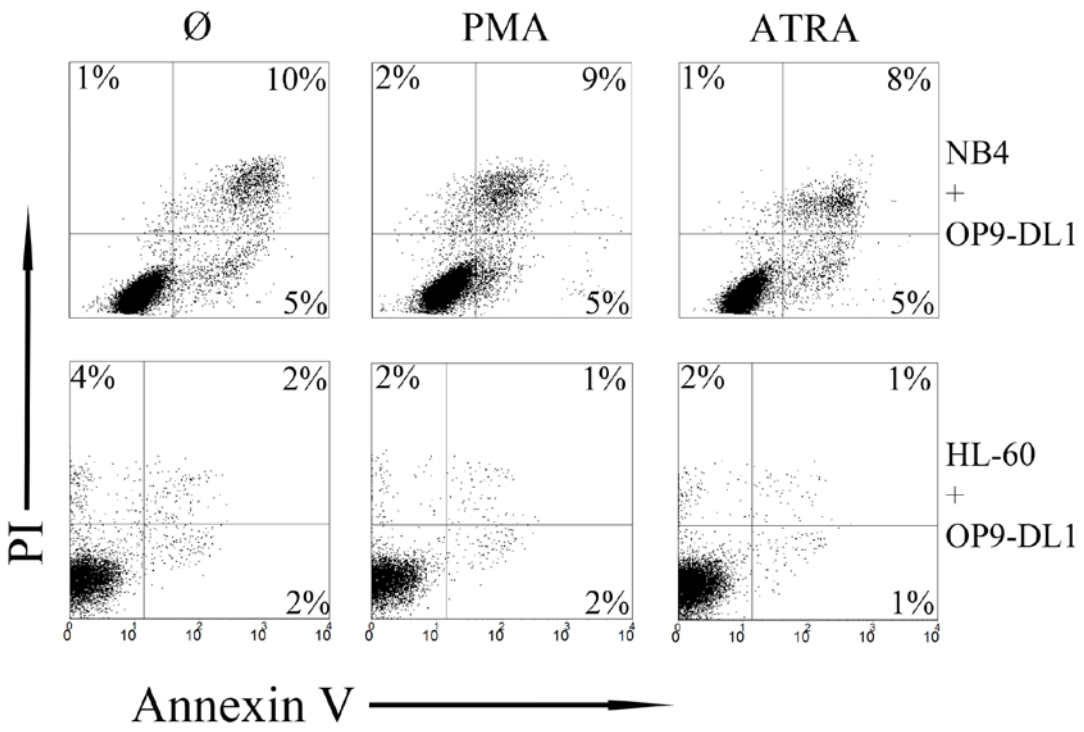
4.3 Utjecaj puta dojavljivanja Notch na spontanu pojavu apoptoze tijekom zajedničkog uzgoja sa stanicama OP9-DL1

Izolirane limfocite šest osoba oboljelih od B-CLL uzgajali smo samostalno ili u prisustvu stanica OP9-DL1. Stanice smo uzgajali dvadeset i četiri sata u mediju za uzgoj stanica OP9 te smo ih inkubirali pri +4°C te +37°C, bez ili u prisustvu OP9-DL1 fibroblasta. Ovim istraživanjem pokazali smo kako kako put dojavljivanja Notch igra bitnu ulogu pri nastanku apoptoze. Na Slici 4.6 vidljivo je smanjenje postotka apoptotskih stanica u slučaju uzgoja limfocita B-CLL u prisustvu OP9-DL1 fibroblasta u odnosu na limfocite uzgajane bez stanica OP9-DL1, iako nismo utvrdili statističku značajnost (Slika 4.6). No, jedan uzorak od šest ispitanih osoba oboljelih od B-CLL pokazivao je znakove rezistencije na apoptozu te paralelan uzgoj s OP9-DL1 nije utjecao na smanjenje postotka apoptotskih stanica. Primjetili smo kako je veći postotak stanica pozitivnih na Annexin V izmjeren kod svih uzoraka (osim B-CLL8) kad su stanice uzgajane samostalno pri 37°C u odnosu na stanice koje su 24h kultivirane pri 4°C. Također, pet uzoraka (B-CLL1, 3-6) imalo je manju učestalost induciranih apoptotskih stanica pri uvjetima od 37°C te u prisustvu stanica OP9-DL1, u odnosu na stanice uzgajane pri temperaturi od 37°C i bez prisustva stanica OP9-DL1 (Slika 4.6). Učestalost postotka apoptotskih stanica mjerenih kod jedne osobe oboljele od B-CLL koje su uzgajane zajedno sa stanicama OP9 slična je postotku apoptotskih stanica koje su uzgajane u odsustvu fibroblasta pri temperaturi od 37°C, što upućuje kako čimbenici lučenja stanica strome nisu dovoljni za spas stanica od apoptotskog procesa kod osoba s B-CLL. Nadalje, stanice dobivene kod jedne osobe oboljele od B-CLL (B-CLL8), koje su uzgajane na podlozi s pričvršćenim OP9-DL1 stanicama imale su veći postotak apoptotskih stanica ukoliko ih usporedimo sa samostalno uzgajanim stanicama bez OP9-DL1 podloge.



Slika 4.6 (a) Postotak apoptotskih stanica izmjeren u uzorcima koštane srži šest osoba oboljelih od B-CLL. Stanice smo uzgajali bez ili u prisustvu OP9-DL1 stanica. Uzgoj stanica te kokultivaciju u trajanju 24 h priredili smo u mediju za uzgoj stanica OP9 te su stanice uzgajane pri različitim uvjetima pri temperaturi od +4°C te +37°C. (Mann-Whitney U test, $p<0,05$). (b) Odabrani prikaz apoptoze dobiven metodom protočne citometrije te različite reakcije stanica dobivenih od dva B-CLL bolesnika prilikom različitih uvjeta prilikom uzgoja (B-CLL1 gornji red, B-CLL8 donji red).

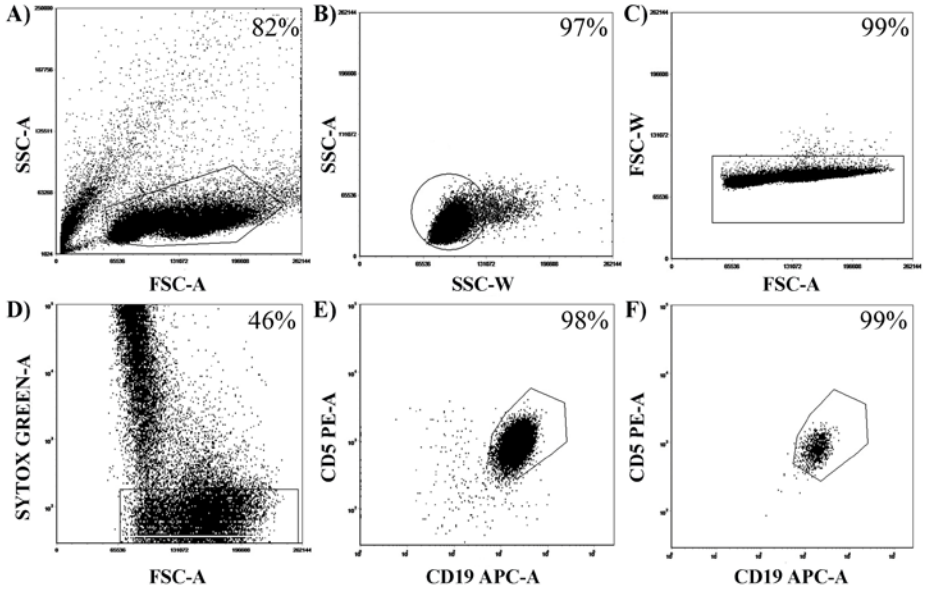
Naknadno smo provjerili i utjecaj puta dojavljivanja Notch na apoptozu kod loza stanica NB4 i HL-60 pri diferencijaciji potaknutoj s agensom PMA (Slika 4.7), pri čemu nismo primjetili značajan utjecaj aktivacije Notcha u navedenim linijama.



Slika 4.7 Analiza apoptoze nakon 24 sata kokultivacije loze stanica NB4 s (donji red) te HL-60 (gornji red) u prisustvu OP9-DL1 stanica. Stanice smo inkubirali s PMA ili ATRA te smo intenzitet fluorescencije Annexina V te propidij jodida mjerili protočnim citometrom. Stanice OP9-DL1 izuzeli smo iz analize na temelju ekspresije zelenog fluorescentnog proteina.

4.4 Razvrstavanje stanica

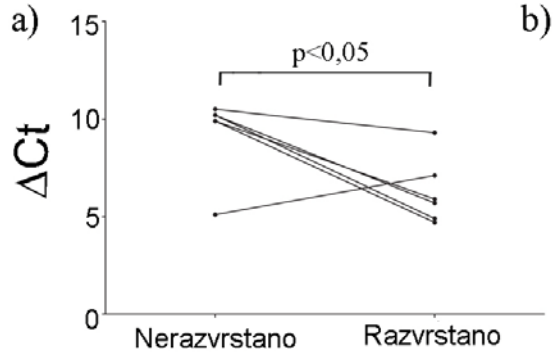
Slika 4.8 prikazuje postupak odabira stanica od interesa korištenjem protočnog razvrstavača. Prilikom razvrstavanja koristili smo metodu pulsnog procesiranja koja uključuje analizu fluorescencijskog signala svakog pojedinog događaja. Pulsno procesiranje uključuje mjerenje širine, visine te površine signala (144) na temelju čega se prilikom razvrstavanja pouzdano mogu izdvojiti samo pojedinačne stanice. Mrtve stanice smo ciljanim obilježavanjem (Sytox green) uklanjali iz analize te smo razvrstavanje živih stanica temeljili na ispoljavanju molekula CD5 te CD19. Naknadno smo proveli i analizu uspješnosti razvrstavanja ponovnim testiranjem dobivenog uzorka protočnim citometrom i utvrdili čistoću razvrstavanja veću od >98%.



Slika 4.8 (a) Odabir stanica od interesa pomoću protočnog razvrstavača stanica. Stanice smo razvrstavali prema veličini i zrnatosti stanica. Okviri napravljeni oko stanica na temelju (b) zrnatosti i (c) veličine promjene širine amplitude signala (eng. pulse width; SSC-W) u odnosu na površinu signala poslužili su nam u uklanjanju staničnih nakupina. (d) Mrtve stanice obilježene sa Sytox green isključili smo iz daljnje analize. (e) Stanice smo potom razvrstavali na temelju ekspresije CD5 PE i CD19 APC nakon čega smo (f) mali dio uzorka pomoću protočnog citometra nanovo analizirali pri čemu smo ustanovili uspješnost samog postupka razvrstavanja.

Za određivanje ekspresije Notch1 koristili smo kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu za uzorke koji su bili razvrstani prema površinskim biljezima ($CD5^+19^+$) te za nerazvrstane uzorke dobivene od istih osoba. Geometrijsku sredinu pokusno dobivenih vrijednosti dva konstitutivno eksprimirana kontrolna gena koristili smo za normalizaciju podataka pri izračunu i analizi vrijednosti ΔCt. Slika 4.9 pokazuje kako je razina ekspresije na razini glasničke RNA značajno viša kod razvrstanih $CD5^+19^+$ stanica u odnosu na mješovitu, nerazvrstanu populaciju stanica istih osoba oboljelih od leukemije.

a)



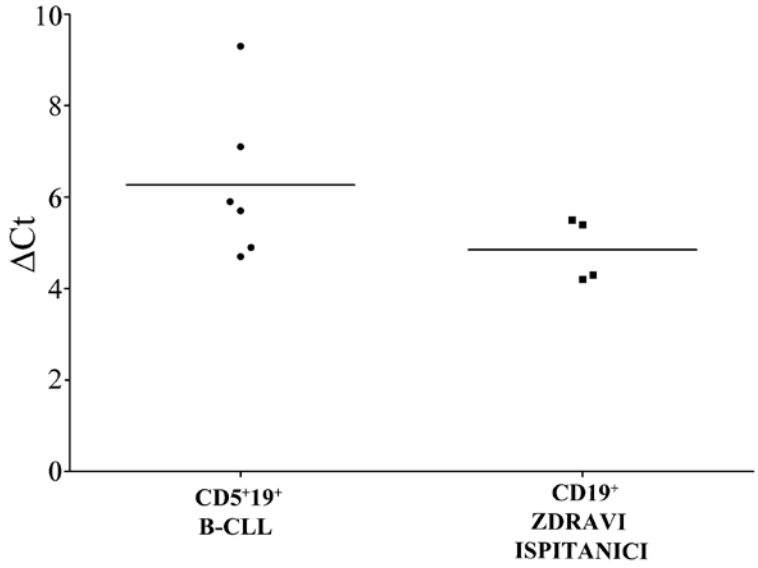
b)

B-CLL	ΔCt Nerazvrstano	ΔCt Razvrstano	$CD5^+19^+$ st. (proteini)	$Notch1^+$ st. (mRNA)
2	9,9	5,9	56	53
5	10,2	4,9	91	52
6	10,2	5,7	87	45
7	9,9	4,7	82	66
8	5,1	7,1	89	25
10	10,5	9,3	71	25

Slika 4.9 Kvantitativna analiza ekspresije glasničke RNA za Notch1 lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu. Razvrstane $CD5^+19^+$ stanice usporedili smo s mješovitom (nerazvrstanom) populacijom istih osoba oboljelih od B-CLL. Linije povezuju rezultat dobiven iz iste osobe oboljele od B-CLL. Mann Whitney U test koristili smo za određivanje statističke značajnosti.

Zanimljivo je kako je B-CLL8 imao drugačiji uzorak ekspresije (ΔCt=5,1 nerazvrstano; ΔCt=7,1 razvrstano) od ostatka poređenih bolesnika. Također, uzorak B-CLL 10 pokazao je manju razliku između nerazvrstanih i razvrstanih (ΔCt=10,5 nerazvrstano; ΔCt=9,3 razvrstano), a znakovito je kako oba navedena bolesnika imaju manji broj Notch1 pozitivnih stanica na razini glasničke RNA (25%, Slika 4.9b). Slika 4.10. prikazuje početnu kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom metodom Taqman napravljenu na 6 uzoraka dobivenih od osoba oboljelih od B-CLL te 4 zdrava darivatelja. Pokazali smo kako nema statistički značajne razlike u ekspresiji glasničke RNA gena za Notch1 između $CD5^+19^+$ stanica koštane srži osoba oboljelih od B-CLL te $CD19^+$ limfocita B periferne krvi zdravih osoba. Metodu razlike u ciklusima pri zadanom pragu očitavanja vrijednosti (ΔCt) koristili

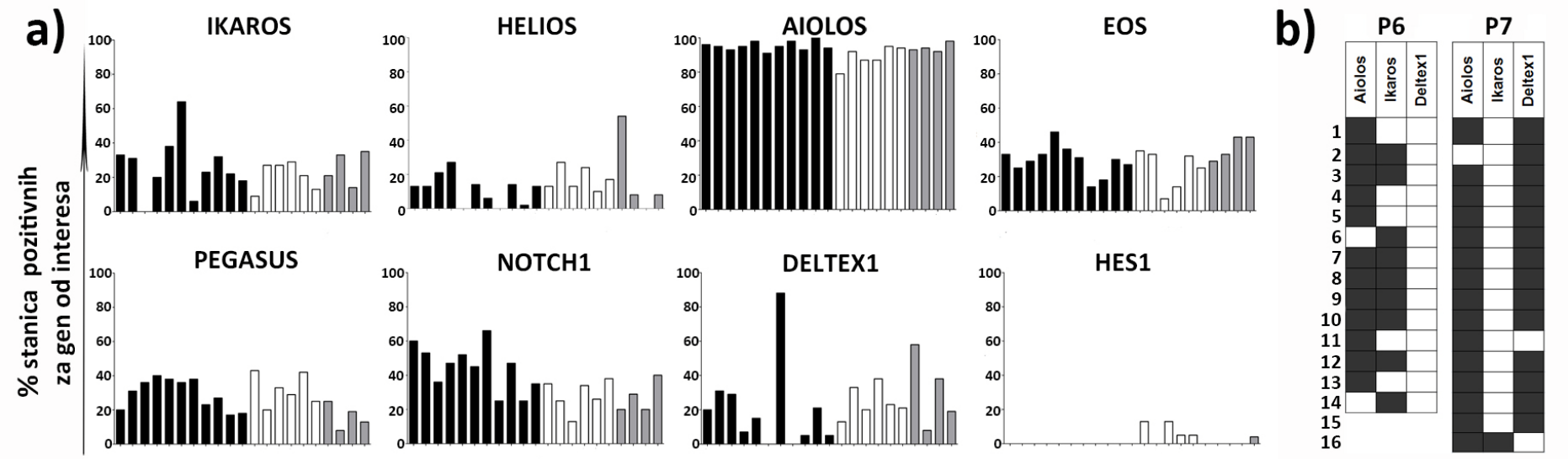
smo pri analizi dobivenih podataka i detekciji promjena ekspresije. Kao interne kontrole koristili smo komercijalno dostupne početnice za metodu Taqman za gene 18S ribosomske RNA (18S rRNA) te za mitohondrijski ribosomski protein L19 (MRPL19, Tablica 3.13). Koristili smo geometrijsku sredinu dvaju navedenih gena prilikom usporedbe Ct vrijednosti (145). Za određivanje genske ekspresije svaki pojedini uzorak napravljen je u triplikatu.



Slika 4.10 Ekspresija Notch1 glasničke RNA u stanicama zloćudnog klona stanica osoba oboljelih od B-CLL (N=6) te perifernih limfocita B zdravih ispitanika (N=4). Svaka točka predstavlja aritmetičku sredinu dobivenih vrijednosti pojedinog ispitanika rađenog u triplikatu.

4.5 Analiza višegenske koekspresije na razini pojedinačnih stanica; povezanost puta dojavljivanja Notch te transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros

Rezultate dobivene na populaciji stanica provjerili smo metodom višestruke lančane reakcije polimerazom na razini pojedinačne stanice. Analizu smo napravili za sve čimbenike obitelji Ikaros (Ikaros, Helios, Aiolos, Eos te Pegasus) kao i za čimbenike puta dojavljivanja Notch (Notch1, Hes1, Deltex1) te smo prikazali koekspresiju navedenih gena na razini glasničke RNA pojedinačnih stanica kod osoba oboljelih od B-CLL te zdravih ispitanika (slika 4.11). Analizirali smo 18-30 stanica po ispitaniku te smo na Slici 4.11 prikazali postotak stanica koje su eksprimirale određeni gen.



Slika 4.11 (a) Višestruka istovremena analiza transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch lančanom reakcijom polimerazom na razini pojedinačnih stanica izoliranih iz osoba oboljelih od B-CLL. ***crno***- $CD5^{+}19^{+}$ stanice osoba oboljelih od B-CLL (s lijeva na desno uzorci B-CLL1-11); ***bijelo***- limfociti B izolirani iz periferne krvi zdravih ispitanika; ***sivo***- $CD5^{-}19^{+}$ stanice koštane srži osoba oboljelih od B-CLL (s lijeva na desno B-CLL8-11). 18-30 stanica analizirali smo za svaki gen po pojedinom uzorku. (b) Prikaz dva različita ekspresijska obrasca analizom koekspresije gena za Aiolos, Ikaros i Deltex1 ispitanika B-CLL, B-CLL6 (N=14) te B-CLL7 (N=16). N predstavlja broj izdvojenih $CD5^{+}CD19^{+}$ analiziranih stanica za pojedinog ispitanika.

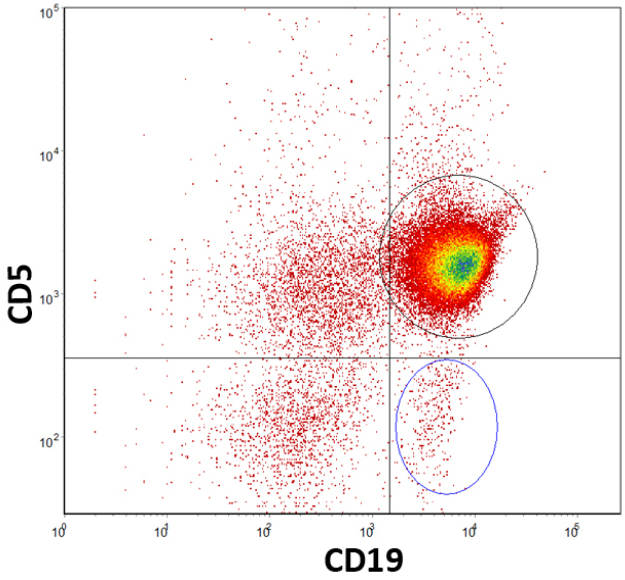
Unatoč dokazanoj ekspresiji navedenih čimbenika, za većinu gena nismo utvrdili razliku u postotku stanica koje eksprimiraju određeni gen od interesa, ukoliko se uspoređuju $CD5^+19^+$ stanice koštane srži osoba oboljelih od B-CLL s limfocitima B periferne krvi zdravih ispitanika, odnosno s $CD5^-19^+$ stanicama koštane srži osoba oboljelih od B-CLL. Također, kod većine uzoraka nismo primjetili ekspresiju Hes1, iako su svi uzorci eksprimirali Notch1. Istovremenom višestrukom analizom koekspresije lančanom reakcijom polimerazom otkrili smo i obostran utjecaj gena za Ikaros i Deltex1 gdje smo pokazali kako $Ikaros^+$ stanice ne eksprimiraju Deltex1, prilikom čega vrijedi i obrnuta situacija gdje $Deltex1^+$ stanice u većini slučajeva nemaju eksprimiran Ikaros. No, u malom postotku ispitanih stanica (18 stanica od 162) stanice su bile $Ikaros^+Deltex1^+$, što je vidljivo u Tablici 4.1. Također se može vidjeti kako $CD5^+19^+$ stanice osoba oboljelih od B-CLL imaju veći postotak stanica pozitivnih na Ikaros u odnosu na periferne limfocite B zdravih ispitanika ili $CD5^-19^+$ stanice koštane srži osoba oboljelih od B-CLL.

Tablica 4.1 Ekspresija Ikarosa i Deltex1 unutar $CD5^+19^+$ stanica osoba oboljelih od B-CLL (N=11), zdravih ispitanika (N=6) te $CD5^-19^+$ stanica koštane srži osoba oboljelih od B-CLL (N=4).

Stanice	Broj stanica	Postotak (%)
B-CLL ($CD5^+19^+$)=82		
$Ikaros^+$ $Deltex1^-$	44	(53)
$Ikaros^-$ $Deltex^+$	33	(40)
$Ikaros^+$ $Deltex^+$	5	(6)
Zdravi ispitanici ($CD19^+$)=39		
$Ikaros^+$ $Deltex1^-$	13	(34)
$Ikaros^-$ $Deltex^+$	18	(46)
$Ikaros^+$ $Deltex^+$	8	(20)
B-CLL ($CD5^-19^+$)=41		
$Ikaros^+$ $Deltex1^-$	15	(36)
$Ikaros^-$ $Deltex^+$	21	(51)
$Ikaros^+$ $Deltex^+$	5	(12)
Ukupno	162	

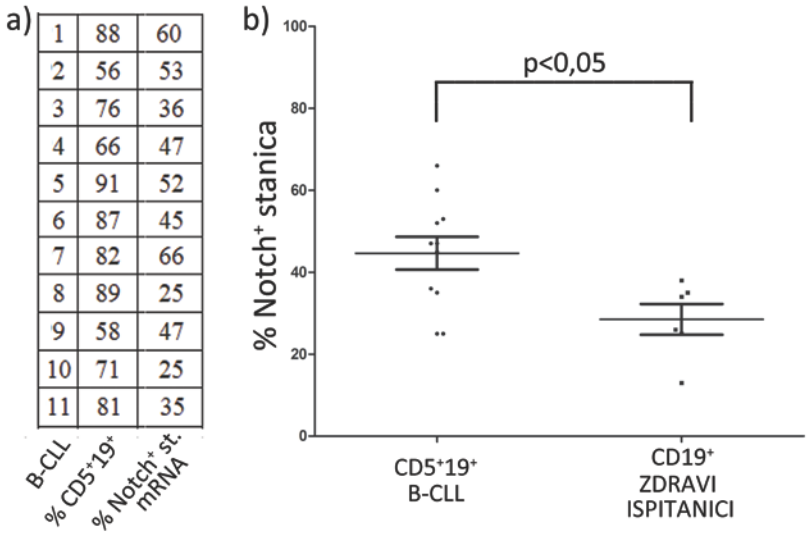
S obzirom na veliku raznolikost između pojedinih osoba te pri radu s humanim materijalom, otežan je postupak definiranja svojstava pravih kontrolnih uzoraka. Prilikom ovog istraživanja uzorke koštane srži osoba oboljelih od B-CLL uspoređivali smo s perifernim limfocitima B zdravih ispitanika, iako bi vjerodostojniju kontrolu u ovom slučaju činili uzorci koštane srži zdravih osoba. U nedostatku istih, napravili smo dodatnu analizu

$CD5^{-}19^{+}$ stanica osoba oboljelih od B-CLL. Slika 4.12 prikazuje način razvrstavanja stanica pri čemu su pohranjene stanice zloćudnog klona te mala populacija $CD5^{-}19^{+}$ limfocita za koje smatramo kako ne pripadaju zloćudnom klonu. Tablica 4.1 pokazuje kako su na temelju koekspresije gena za Ikaros i Deltex1 $CD5^{-}19^{+}$ stanice koštane srži oboljelih po postotku stanica sličnije limfocitima B periferne krvi, dok $CD5^{+}19^{+}$ stanice imaju povišen broj $Ikaros^{+}Deltex^{-}$ stanica.



Slika 4.12 Razvrstavanje stanica uzoraka oboljelih od B-CLL. Unutar istog uzorka razvrstali smo $CD5^{+}19^{+}$ limfocite zloćudnog klona te limfocite s fenotipom $CD5^{-}19^{+}$ koje smo koristili za međusobnu usporedbu.

Razliku u frekvenciji pozitivnih stanica unutar $CD5^{+}19^{+}$ stanica kod osoba oboljelih od B-CLL te zdravih ispitanika primjetili smo kod ekspresije Notch1 gena. $CD5^{+}19^{+}$ B-CLL stanice imaju više $Notch1^{+}$ stanica ukoliko se uspoređuju s perifernim limfocitima B zdravih kontrola (Slika 4.13). Prosječno 46% B-CLL stanica koje su $CD5^{+}CD19^{+}$ je ujedno bilo i Notch1 pozitivno, dok je na Notch1 kod perifernih limfocita B bilo pozitivno 29% stanica.



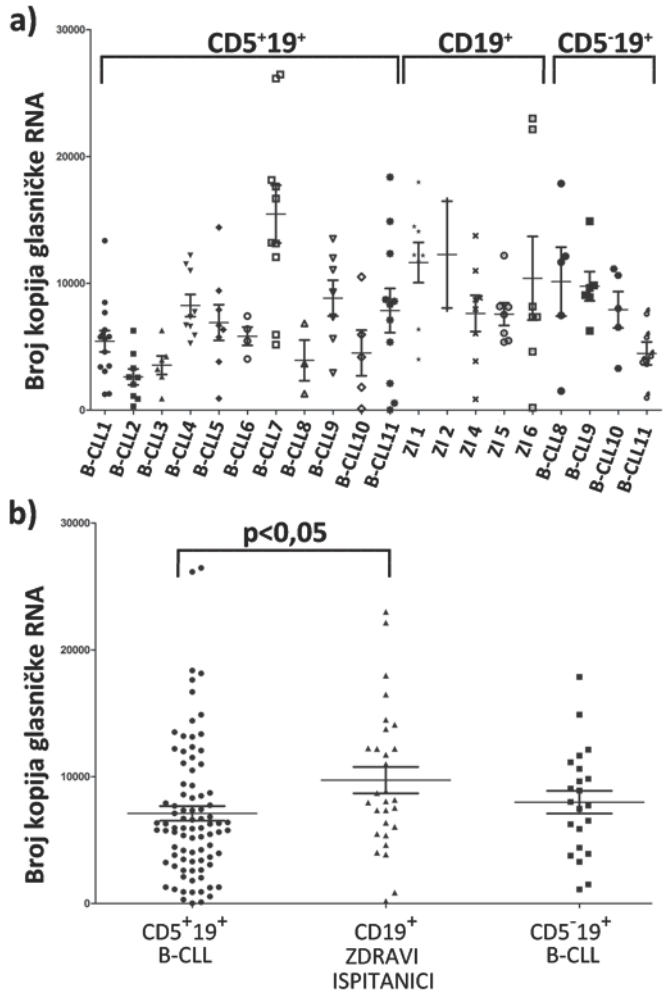
Slika 4.13 (a) Postotak $CD5^{+}19^{+}$ stanica osoba oboljelih od B-CLL prilikom postupka razvrstavanja te postotak unutar $CD5^{+}19^{+}$ stanica pozitivnih na Notch1 na razini glasničke RNA. (b) Usporedba postotaka stanica pozitivnih na Notch1, primjenom metode višestruke lančane reakcije polimerazom na pojedinačnim stanicama, između $CD5^{+}19^{+}$ stanica osoba oboljelih od B-CLL (B-CLL1-11) i $CD19^{+}$ stanica zdravih ispitanika (N=6). Svaka točka predstavlja pojedinu osobu te pripadajući postotak stanica pozitivnih na Notch1. 57± 14 stanica analizirano je po pojedinačnom uzorku ($p<0,05$, Mann Whitney U test).

4.6 Mjerenje apsolutnog broja kopija molekula glasničke RNA Notch1 u stanicama zdravih ispitanika te kod stanica zloćudnog klona B-CLL

Napravili smo kvantitativnu analizu lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu na limfocitima $CD5^{+}19^{+}$ dobivenim iz koštane srži jedanaest osoba oboljelih od B-CLL (B-CLL1-11), limfocitima B izoliranim iz pet uzoraka periferne krvi zdravih ispitanika te $CD5^{-}19^{+}$ limfocitima koštane srži dobivenim od četiri uzorka oboljela od B-CLL (B-CLL8-11), što je prikazano na Slici 4.14. Ukupni broj kopija molekula glasničke RNA mjerili smo prema određenoj količini molekula glasničke RNA vanjskog standarda (ekspresija CD3). Apsolutni broj molekula glasničke RNA gena Notch1 nije podjednak u svim praćenim uzorcima. Unutar zloćudnog klona pet je uzoraka (B-CLL1, 2, 3, 8, 10) imalo sličan uzorak ekspresije s ukupno manjim brojem molekula glasničke RNA po stanici. U $CD5^{-}19^{+}$ limfocitima osobe oboljele od B-CLL (B-CLL11) također je izmjeren manji broj Notch1 molekula. S druge strane, uzorci B-CLL4, 5, 6, 9, 11 imaju umjereno povećan broj molekula

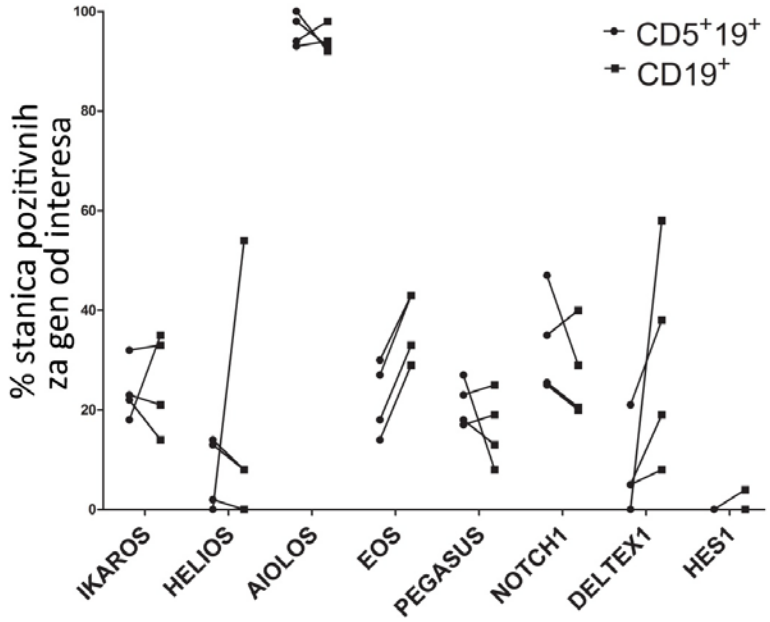
u odnosu na uzorke zdravih ispitanika, dok je uzorak B-CLL7 imao izrazito veći broj molekula Notch1, no to povećanje nije dostignuto i na razini proteina (Slika 4.5).

Kvantitativnom višestrukom analizom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu na razini pojedinačne stanice pokazali smo kako $CD19^{+}$ limfociti periferne krvi zdravih ispitanika imaju veći broj kopija glasničke RNA Notch1 molekula u usporedbi s $CD5^{+}19^{+}$ stanicama B-CLL, dok između medijana $CD5^{-}19^{+}$ stanica koštane srži osoba oboljelih od B-CLL te dviju prethodno navedenih populacija stanica nismo pokazali statistički značajnu razliku (Slika 4.14). Nadalje, unutar istog uzorka postoje varijacije u broju kopija glasničke RNA po stanici. Na Slici 4.14 moguće je vidjeti različite grupe stanica razvrstane prema broju eksprimiranih Notch1 molekula. Distribucija stanica kod svih uzoraka uglavnom pokazuje razdiobu stanica u tri podgrupe: stanice koje eksprimiraju do 9000 molekula, stanice koje eksprimiraju do 15000 kopija, te stanice koje ekprimiraju više od 15000 kopija.



Slika 4.14 (a) Ukupan broj kopija glasničke RNA gena Notch1 po stanici kod $CD5^{+}19^{+}$ zloćudnog klona (B-CLL1-11) te stanica $CD5^{-}19^{+}$ (B-CLL8-11) izoliranih iz osoba oboljelih od B-CLL te zdravih ispitanika (ZI1-2, ZI4-6). Svaka točka predstavlja jednu stanicu dok linije predstavljaju srednju vrijednost zajedno sa standardnom pogreškom srednje vrijednosti. Apsolutni broj molekula glasničke RNA za Notch1 mjerili smo prema vanjskom standardu kojemu smo prethodno utvrdili broj kopija. (b) Prikaz sažetih podataka svih osoba oboljelih od B-CLL, zdravih ispitanika te uzoraka $CD5^{-}19^{+}$ stanica dobivenih iz četiri osobe koje boluju od B-CLL. (Mann-Whitney U test, $p<0,05$).

S obzirom kako se po broju kopija gena Notch1 $CD5^{-}19^{+}$ stanice osoba oboljelih od B-CLL nisu razlikovale od $CD5^{+}19^{+}$ populacije, koekspresijskom analizom višestruke lančane reakcije polimerazom pokazali smo razliku u postotku pozitivnih stanica na transkripcijske čimbenike iz obitelji Ikaros i puta dojavljivanja Notch te smo napravili usporedbu (N=4, B-CLL8-11). Kod svih ispitanika ustanovili smo manji postotak Eos i Deltex1 pozitivnih stanica u $CD5^{+}19^{+}$ stanicama u usporedbi s $CD5^{-}19^{+}$ stanicama (Slika 4.15). Kod svakog ispitanika usporedba frekvencije limfocita pozitivnih na gene od interesa rađena je na 21-24 limfocita $CD5^{+}19^{+}$ te na istom broju $CD5^{-}19^{+}$ limfocita (izuzetak je B-CLL9 , kod kojeg je analizirano 12 stanica unutar $CD5^{-}19^{+}$ populacije limfocita, nasuprot 22 analizirana limfocita unutar $CD5^{+}19^{+}$ zloćudnog klona).



Slika 4.15 Razlika u postotku genske ekspresije transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch kod zloćudnog klona $CD5^{+}19^{+}$ te $CD5^{-}19^{+}$ stanica uzoraka koštane srži osoba oboljelih od B-CLL. Svaka linija predstavlja jednu osobu oboljelu od B-CLL.

5 Rasprava

Put dojavljivanja Notch jedan je od najbitnijih signalnih puteva pri razvoju i diferencijaciji hematopoetskih stanica te je njegova neprirodno poremećena ekspresija potvrđena u velikom broju leukemijskih oboljenja. Poremećaji puta dojavljivanja Notch kod leukemija prvi put je uočena putem otkrića mutacija u genu za Notch1 kod osoba oboljelih od akutne leukemije limfocita T (41). Štoviše, Wang i sur. pokazali su kako više od 50% osoba oboljelih od T-ALL posjeduju mutacije u izvanstaničnoj domeni HD te u domeni PEST smještenoj na C-kraju samog proteina Notch1 (55). Slične mutacije pronađene su također i u kroničnoj leukemiji limfocita B, dok uloga puta dojavljivanja Notch u B-CLL nije u potpunosti razjašnjena (110, 111). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako je kod osoba oboljelih od B-CLL put dojavljivanja Notch dereguliran putem sustavne i trajne ekspresije aktiviranog čimbenika Notch1 (4). Isti autori pokazali su kako sakupljeni uzorci perifernih limfocita ne eksprimiraju Notch na razini proteina. Međutim, naši rezultati potvrđuju ekspresiju Notch1 na razini glasničke RNA i proteina kod svih ispitanih osoba oboljelih od B-CLL. No, niti u jednom slučaju nismo očitali prekomjernu ekspresiju proteina Notch1 u odnosu na razinu ekspresije beta-aktina. Također, prisutnost Notch1 potvrdili smo i kod ispitanih uzoraka periferne krvi zdravih osoba. Kod jednog uzorka očitali smo sličnu količinu ukupnog proteina Notch1 kao i kod osoba oboljelih od B-CLL, dok je drugi zdravi ispitanik imao nižu ekspresiju Notch1. Uzorak osobe oboljele od akutne mijeloidne leukemije bio je u potpunosti negativan, što odgovara otprije objavljenim podacima (5). Jedino je kod loze stanica MOLT-4 očitana viša ekspresija Notch1 u odnosu na beta-aktin, što također odgovara otprije poznatim podacima (146). Nadalje, aktivirani oblik Notch1 nismo detektirali niti u jednom od ispitanih uzoraka osoba oboljelih od B-CLL (loze stanica Jurkat i MOLT-4 poslužile kao pozitivna kontrola), što je u suprotnosti s dosad objavljenim rezultatima (4). Različite veličine dobivenih odsječaka kod Jurkat i MOLT-4 prethodno su opisane u literaturi, a uzrok su im opetovane mutacije u području PEST (sekvenca bogata prolinom, glutamatom, serinom i treoninom), na C-kraju proteina Notch1 (147).

Kad je riječ o ekspresiji čimbenika Hes1, Hajdu i sur. pokazali su na razini glasničke RNA kako je razina ciljnog gena puta dojavljivanja Notch niža u odnosu na zdrave ispitanike, predlažući kako Notch nije prekomjerno aktiviran u osoba oboljelih od B-CLL (112). No, ekspresija Hes1 ne mora uvijek biti izravno povezana s putem dojavljivanja Notch, s obzirom na dokazanu upletenost čimbenika Hes1 i u druge puteve dojavljivanja (npr. Hedgehog) (63).

Na razini glasničke RNA nismo očitali nikakav stupanj razlike među uzorcima osoba oboljelih od B-CLL u odnosu na zdrave ispitanike, iako razina ekspresije gena Notch1 izravno ovisi o subpopulaciji stanica. Drugim riječima, analizom na nerazvrstanim i razvrstanim uzorcima pokazali smo kako u slučaju B-CLL zloćudni klon $CD5^{+}19^{+}$ stanica eksprimira više Notch1 nego ostale subpopulacije zajedno. Iznimka je uzorak osobe oboljele od B-CLL P8, koji je imao manji broj kopija gena Notch1 u usporedbi s vlastitim $CD5^{-}19^{+}$ limfocitima koštane srži. Taj nalaz ukazuje na heterogenu ekspresiju Notch1 unutar skupine ispitanika s B-CLL-om. Glavni problem kod analiza na uzorcima koji se sastoje od velikog broja stanica je njihovo usrednjavanje, s obzirom na činjenicu kako je dobiveni rezultat npr. ekspresije određenog biljega srednja vrijednost svih ispitanih stanica. Proces usrednjavanja često može prikriti bitne informacije i podatke o samom uzorku. Kod metoda, poput kvantitativne višestruke lančane reakcije polimerazom ili enzimskog imunološkog testa vezanog na površinu (ELISA, eng. Enzyme-linked immunosorbent assay), može se dogoditi da nekoliko stanica koje prekomjerno eksprimiraju gen od interesa daju isti rezultat kao i mnoštvo niskoeksprimirajućih stanica (148). No, pored pozitivnih svojstava istraživanja na pojedinačnim stanicama, utvrđeno je kako koekspresijska analiza na više od 5 gena u pojedinoj stanici dovodi do nespecifičnih inhbicija te lažno negativnih rezultata (149). Daljnjim istraživanjima omogućeno je praćenje do dvadeset gena istodobno (140). Tijekom ovog istraživanja pratili smo istodobnu ekspresiju osam gena iz obitelji transkripcijskih čimbenika Ikaros te puta dojavljivanja Notch. Po prvi put smo pokazali istodobnu ekspresiju navedenih čimbenika u osoba oboljelih od B-CLL. Neki geni nisu bili eksprimirani u osoba s B-CLL što je u skladu s nekim od prijašnjih istraživanja (112). Nadalje, istraživanjem na pojedinačnim stanicama pokazali smo kako Ikaros igra bitnu ulogu u represiji transkripcije ciljnog gena puta dojavljivanja Deltex1. Geimer Le Lay i sur. koristili su metodu ChiP sekvenciranja u modelu gdje su regulirali funkciju određenih gena (inaktiviranje gena ili povećanje ekspresije) kako bi odredili gene koji su pod izravnom kontrolom transkripcijskih čimbenika Ikaros i Notch. U slučaju delecije gena Ikarosa zapažena je kontinuirana ekspresija ciljnih gena puta dojavljivanja Notch te ubrzana pojava leukemija, utvrdivši ulogu Ikarosa kao jednog od ključnih čimbenika moduliranja puta dojavljivanja Notch u timocitima (119). Chari i sur. također su pokazali kako je ponovna ekspresija Ikarosa unutar miševa koji su prethodno bili deficijentni za Ikaros dovela do smanjenja ekspresije ciljnih gena puta dojavljivanja Notch poput Hes1 te Deltex1 (90). Prilikom koekspresijske analize, kod dvije

osobe oboljele od B-CLL pronašli smo razliku u koekspresiji Ikarosa i Deltex1 što pridonosi hipotezi kako Ikaros igra bitnu ulogu u moduliranju puta dojavljivanja Notch. Također, možemo ustanoviti kako nisu sve stanice koje su pozitivne na Ikaros, ujedno i negativne na Deltex1 (vrijedi i obrnuto), što podrazumijeva i sudjelovanje nekog drugog mehanizma međukontrole ekspresije. Druga mogućnost je kako se mora prijeći određeni prag ekspresije u slučaju transkripcijskog čimbenika Ikaros, kako bi moglo doći do utjecaja na ekspresiju Deltex1. To upućuje na mehanizam kompetitivne inhibicije između transkripcijskih čimbenika Ikaros i Deltex1 u B-CLL. U literaturi je opisan antagonizam između dva navedena gena, pri čemu se Ikaros veže na regulatornu regiju gena Deltex1 (91). Drugi čimbenici također mogu biti uključeni u regulaciju Ikarosa i Deltex1 što bi moglo objasniti pojavnost dvostruko pozitivnih stanica. Zanimljiv je i odnos postotaka među subpopulacijama u odnosu na ekspresiju Ikarosa i Deltex1, gdje $CD5^{+}19^{+}$ stanice imaju više $Ikaros^{+}$ stanica u odnosu na periferne limfocite B zdravih ispitanika, kod kojih prevladavaju $Deltex1^{+}$ limfociti. Suprotno, postoci limfocita $CD5^{-}19^{+}$ koštane srži osoba koje boluju od B-CLL koje eksprimiraju Ikaros I Deltex1 sličnije su stanicama zdravih ispitanika (Tablica 4.1).

Geimer Le Lay i sur. pokazali su kako Ikaros regulira ekspresiju ciljnih gena ovisnih o Notchu na način da nedostatak ekspresije Notcha dovodi do otvorene kromatinske strukture te olakšavanja prepisivanja ciljnih gena (119). Ovim istraživanjem pokazali smo kako je postotak stanica koje su pozitivne za Notch1 na razini glasničke RNA veći u odnosu na limfocite B zdravih ispitanika. Usporedbom stanica pozitivnih za Notch1 unutar različitih subpopulacija istih bolesnika ($CD5^{-}19^{+}$ stanice nasuprot zloćudnom klonu $CD5^{+}19^{+}$) došli smo do saznanja kako neki bolesnici imaju mali postotak Notch1 pozitivnih stanica unutar $CD5^{-}19^{+}$ subpopulacije te su sličniji perifernim limfocitima B zdravih ispitanika. S druge strane, postotak $Notch1^{+}$ stanica unutar subpopulacije $CD5^{-}19^{+}$ nekih osoba oboljelih od B-CLL jednak je onom unutar zloćudnog $CD5^{+}19^{+}$ klona. Rezultat dobiven u odnosu na ekspresiju Notch1 upućuje na činjenicu kako limfociti B izolirani iz koštane srži osobe oboljele od B-CLL nisu idealna kontrola zloćudnom dvostruko pozitivnom klonu. No, koekspresijskom analizom dvaju navedenih populacija pokazali smo određene razlike među $CD5^{-}19^{+}$ te $CD5^{+}19^{+}$ subpopulacijama upućujući na činjenicu kako i neki drugi čimbenici unutar isprepletenosti transkripcijske mreže mogu biti značajni, poput čimbenika Eos i Deltex1. Općenito gledano, postotak stanica pozitivnih za neki gen, u kombinaciji s brojem

kopija eksprimiranih po pojedinačnoj stanici tvore izvrstan alat prilikom predviđanja kvantifikacije genske ekspresije. Prilikom ovog istraživanja izmjerili smo apsolutni broj molekula glasničke RNA za Notch1 u pojedinoj stanici osoba oboljelih od B-CLL te smo rezultate usporedili s brojem kopija Notch1, dobivenim iz perifernih limfocita B zdravih osoba. Periferni limfociti B zdravih osoba imali su veći broj kopija glasničke RNA po pojedinačnoj stanici, u usporedbi sa stanicama zloćudnog klona. Prosječan broj kopija u $CD5^-$ 19^+ subpopulaciji smješten je između vrijednosti dobivenih u zloćudnom klonu te perifernim limfocitima zdravih ispitanika. Nadalje, unutar zloćudnih stanica moguće je razlikovati stanice s različitom razinom ekspresije kopija glasničke RNA gena za Notch1. S obzirom na navedeno, daljnja istraživanja moguće je temeljiti na različitoj ekspresiji Notch1, no ulogu ekspresije Notcha na razini glasničke RNA kao prognostičkog biljega treba utvrditi dodatnim istraživanjima.

Konstitutivno prisutan unutarstanični dio receptora Notch1-4 inhibira rast te potiče apoptozu u mišjim i ljudskim lozama limfocita B, dok loze stanica limfocita T nisu zahvaćene. Sličan rezultat dobiven je i u slučaju loza stanica akutne leukemije limfocita B, gdje je Notch aktiviran kokultivacijom sa stanicama fibroblasta koje eksprimiraju ligande puta dojavljivanja Notch (Jagged1, Jagged 2). Također, istraživači su zaključili kako je Hes1 odgovoran za inhibiciju staničnog rasta te začinjanje procesa apoptoze u slučaju mišjih i ljudskih loza stanica B-ALL (150). Uloga Notcha kao onkogena poprilično je dobro definirana u određenim vrstama hematoloških oboljenja (T-ALL, B-CLL) dok se u drugim ponaša kao supresor tumora (AML), što se objašnjava izrazito visokim utjecajem okolišnih čimbenika (151). Hajdu i sur. pokazali su kako utjecaj inhibitora gama-sekretazne aktivnosti DAPT ili ligand puta dojavljivanja Notch (Dll4) ne utječu na staničnu proliferaciju te na pojavu spontane apoptoze loze stanica Jurkat. No, Dll4 je u stanju aktivirati ekspresiju Hes1 u stanicama Jurkat, dok je DAPT utjecao na smanjenje ekspresije Hes1 na razini glasničke RNA. U istom istraživanju, autori su ispitivali utjecaj aktivacije puta dojavljivanja Notch putem Dll4 na pojavu apoptoze kod osoba oboljelih od B-CLL, no nisu pronašli značajnu razliku između stanica kokultiviranih s Dll4 u odnosu na stanice koje su rasle samostalno (152). Kannan i sur. pokazali su u osoba oboljelih od B-ALL kako Hes1 međudjeluje s PARP1, na način da se smanjuje utjecaj Hes1 dok se PARP cijepa te na taj način regulira proapoptotske signale. Drugim riječima, međudjelovanje između Hes1 i PARP1 modulira

transkripcijski utjecaj čimbenika Hes1 te rezultira pojavom apoptoze posredovane čimbenikom PARP1 (153). Hubmann i sur. pokazali su kako je Notch2 prekomjerno eksprimiran kod osoba oboljelih od B-CLL te kako je CD23 ciljni gen puta dojavljivanja Notch2 (154). Kamdje i sur. izlagali su stanice B-ALL protutijelima specifičnim za neutralizaciju puta dojavljivanja Notch i s inhibitorom gama-sekretaza te su pokazali kako je navedeno izlaganje smanjilo preživljenje stanica B-ALL bez obzira jesu li uzgajali stanice u prisustvu ili odsustvu stromalnih stanica. Nadalje, uočili su kako je kokultivacija stanica B-ALL s mezenhimskim stanicama matica izoliranim iz koštane srži povećala preživljenje B-ALL stanica (155). U prilog uloge Notch1 u preživljavanju stanica pokazano je pokusima gdje smanjenje ekspresije Notch korištenjem snRNA (eng. small nuclear RNA) dovodi do apoptoze stanica osoba oboljelih od B-CLL (4). Kako bi se funkcionalno uvidjela uloga puta dojavljivanja Notch u B-CLL, napravili smo analizu apoptoze nakon 24 sata inkubacije u prisutnosti ili odsustvu OP9-DL1 stanica. Ovim istraživanjem potvrdili smo otprije poznatu činjenicu kako stanice B-CLL spontano umiru apoptozom bez prisustva stanica hranilica (fibroblasta) (3). Također smo potvrdili kako stanice osoba oboljelih od B-CLL uzgajane u prisustvu fibroblasta OP9-DL1 imaju manji postotak apoptotskih stanica, ukazujući na zaštitnu ulogu aktivacije puta dojavljivanja Notch u razvoju apoptoze. Ovi rezultati slažu se s prethodno objavljenim sličnim istraživanjima (4). No, nisu svi ispitanici reagirali podjednako. Jedan od šest oboljelih ispitanika (B-CLL8) imao je veći postotak apoptotskih stanica nakon kultivacije na OP9-DL1 u odnosu na limfocite B-CLL rasle u odsustvu fibroblasta. Takav rezultat potvrđuje kako se u slučaju B-CLL radi o heterogenoj bolesti ovisno o potencijalu stanica da se odupru spontanoj smrti. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se rasvijetlila dvojaka uloga Notch-a pri nastanku apoptotskih procesa. Oboljelom ispitaniku (B-CLL8) izmjerili smo i mali postotak $Notch1^{+}$ stanica na razini glasničke RNA (25%) prilikom koekspresijske analize lančanom reakcijom polimerazom na pojedinačnim stanicama. Različita sudbina stanica osoba koje imaju drugačiji uzorak ekspresije Notch1 mogla bi biti dobar prognostički čimbenik tijekom individualnih analiza. Dodatna istraživanja potrebna su kako bi se razotkrile veze između ekspresije Notch1 te različitih prognostičkih i dijagnostičkih mogućnosti. Pored utjecaja puta dojavljivanja Notch u limfocitnim B i T leukemijama (T-ALL i B-CLL), sve je više dokaza o utjecaju navedenog puta u najčešćoj vrsti akutne leukemije kod odraslih, akutnoj mijeloidnoj leukemiji. Put dojavljivanja Notch od iznimne je važnosti pri razvoju limfocita B te limfocita T, dok se njegova uloga u mijeloidnim

lozama stanica počela tek nedavno pomnije proučavati. U istraživanjima s oprečnim rezultatima pokazano je kako put dojavljivanja Notch kod mijeloidnih prekursora utječe na samoobnavljanje, inducira/inhibira diferencijaciju te (ne) utječe na apoptozu (28, 156, 157). Tako su Schroeder i sur. pokazali kako putem aktivacije kompleksa RBP-J Notch potpomaže mijeloidnu diferencijaciju te inducira ekspresiju CD11b (158). Murata-Ohsawa i sur. utvrdili su kako utjecaj liganda Dll1 može imati suprotan učinak na diferencijaciju mjerenu ekspresijom površinskih biljega specifičnih za mijeloidnu lozu. Tako je npr. kod loze stanica OCI/AML6 opaženo smanjenje ekspresije CD11b, dok je kod loze stanica THP-1 došlo do povećanja ekspresije CD11b, mjerene protočnom citometrijom (159). Mjerenje diferencijacije AML stanica nakon izlaganja PMA i uz prisustvo aktivacije puta dojavljivanja Notch1 rezultira nižom ekspresijom biljega CD11b i stanične diferencijacije (Slika 8.2).

U literaturi postoje suprotni nalazi vezano za ekspresiju Notch receptora i pripadajućih liganada. Li i sur. pokazali su ekspresiju receptora i liganada puta dojavljivanja Notch na razini glasničke RNA pri čemu kod HL-60 stanica nije bilo eksprimirane RNA za Notch1, Notch3 i Dll1, dok je čimbenicima Notch2, Notch4 te ligandima Dll4 i Jagged1 dokazana ekspresija (160). Našim pokusima potvrdili smo ekspresiju Notch1 na razini glasničke RNA u HL-60 i NB4 stanicama (Slika 4.1). Također smo pokazali kako se pri diferencijaciji loze stanica NB4 potaknutoj ATRA-om smanjuje ekspresija čimbenika Hes1, ciljnog gena puta dojavljivanja Notch. Paralelno s pojavom površinskog biljega CD11b dolazi do smanjivanja ekspresije Hes1 na razini glasničke RNA te smo odsutnost ekspresije Hes1 mogli uočiti nakon dvadeset sati inkubacije pri čemu je potvrđena uloga čimbenika Hes1 pri diferencijaciji izazvanoj ATRA-om (Slika 4.4). No, kultivacijom loza stanica HL-60 te NB4 na fibroblastima OP9-DL1 nismo uočili promjene u diferencijaciji u odnosu na stanice uzgajane na OP9 fibroblastima. Uloga te sam mehanizam ATRA-e u ovom procesu nije istražen, no poznato je kako kod puteva dojavljivanja Notch te puta ovisnog o receptoru RARα sudjeluju i neke zajedničke molekule poput p300, CBP1 te kompleksa NCor/SMRT/HDAC (161, 162). Reineke i sur. pokazali su kako endogeni PML-RARα reagira s CBP1 te p300 te spominje kako navedeni put igra ulogu u smanjenju transkripcijske aktivacije efektora CBP1 (161). Jedno od mogućih objašnjenja koje proizlazi iz dobivenih rezultata je kako aktivacija puta dojavljivanja Notch preko liganda Dll1 nema utjecaja na transkripciju ciljnih gena puta dojavljivanja Notch, s obzirom kako vjerojatno dolazi do inhibicije transkripcije u trenutku u

kojem jedan od navedenih čimbenika počinje imati svoju ulogu koju, međutim, ne može ispuniti. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se utvrdili čimbenici koji omogućuju inhibiciju učinka puta dojavljivanja Notch po stimulaciji puta ovisnog o receptoru RARα.

Pokazano je kako aktivacija puta dojavljivanja Notch dovodi do inhibicije rasta mijeloidne loze stanica te zastoja u proliferaciji (5). Osim toga, indukcija putem aktivacije Notcha vodi do apoptoze, smanjujući ekspresiju Bcl-2. Negativni utjecaj aktivacije Notch1 na proliferaciju uslijed vjerojatne apoptoze nediferenciranih HL-60 stanica akutne mijeloidne leukemije suprotan je učinku na stanice koje su uzgajane uz dodatak PMA (Prilog A, Slika 8.4) (138). Nasuprot tome, Muhrata-Ohsawa i sur. pokazali su kako solubilni ligand Dll1 nije utjecao na povećanje postotka apoptotskih stanica mijeloidne loze stanice THP-1 (159). Međutim izgleda da učinak aktivacije puta dojavljivanja Notch1 ovisi o korištenoj metodi te o vrsti stanica s obzirom na različite rezultate i mehanizme koje isti ligand može izazvati u različitim stanicama.

6 Zaključak

Prilikom istraživanja dobili smo nove spoznaje o putu dojavljivanja Notch te transkripcijskim čimbenicima iz obitelji Ikaros na području diferencijacije, staničnog rasta, proliferacije te sveukupnog razvoja hematopoetskih stanica.

- Pokazali smo ekspresiju ukupnog te aktiviranog oblika proteina Notch1 kod osoba oboljelih od B-CLL. Svi ispitani uzorci osoba oboljelih od B-CLL bili su pozitivni na ukupni Notch, dok prisustvo aktiviranog oblika nismo uočili niti na jednom ispitaniku.

- Kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu metodom Taqman pokazali smo kako zloćudni klon $CD5^{+}19^{+}$ najviše pridonosi ukupnoj ekspresiji Notch1 kod osoba koje boluju od B-CLL. Također, pokazali smo kako razvrstane stanice $CD5^{+}19^{+}$ ispitanih osoba koje boluju od B-CLL nisu imale višu ekspresiju Notch1 na razini glasničke RNA u usporedbi s uzorcima perifernih limfocita B zdravih osoba.

- Višestrukom analizom lančanom reakcijom polimerazom potvrdili smo ekspresiju svih transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros kod osoba oboljelih od B-CLL.

- Kod nekih osoba oboljelih od B-CLL primjetili smo na razini glasničke RNA pojedinačnih stanica međusobni antagonistički učinak djelovanja gena za Ikaros i Deltex1.

- Višestrukom analizom lančanom reakcijom polimerazom na razini pojedinačne stanice pokazali smo kako osobe oboljele od B-CLL imaju viši postotak stanica pozitivnih na Notch1 na razini glasničke RNA, u usporedbi s perifernim limfocitima B zdravih osoba.

- Utvrdili smo kako je broj kopija molekula glasničke RNA po pojedinačnoj stanici u prosjeku veći kod perifernih limfocita B, u usporedbi s uzorcima osoba oboljelih od B-CLL.

- Na razini glasničke RNA uočili smo razliku u postotku Eos te Deltex1 pozitivnih stanica između zloćudnih $CD5^{+}19^{+}$ te jednostruko pozitivnih $CD19^{+}$ stanica koštane srži unutar istih osoba oboljelih od B-CLL. Kod oba gena $CD5^{+}19^{+}$ stanice imale su niži postotak pozitvnih stanica od jednostruko pozitivne populacije.

- Put dojavljivanja Notch utječe na spontanu pojavu apoptoze kod B-CLL: kod pet od šest ispitanih uzoraka stanice uzgajane na OP9-DL1 te inkubirane pri 37°C imale su manji postotak apoptotskih stanica u odnosu na stanice koje su rasle bez prisustva OP9-DL1 stanica. No, analizom jednog uzorka od šest primjetili smo i obrnut slučaj. Rezultati upućuju na dvojaku ulogu Notcha te pokazuje kako se u slučaju B-CLL radi o heterogenoj bolesti. U slučaju loza stanica HL-60 i NB4, pokazali smo kako aktivacija puta dojavljivanja Notch nije utjecala na postotak apoptotskih stanica.

- U slučaju loza stanica akutne mijeloidne leukemije potvrdili smo ekspresiju transkripcijskih čimbenika iz obitelji Ikaros te puta dojavljivanja Notch, pri čemu je Deltex1 imao vrlo slabu razinu ekspresije (HL-60) ili ga se nije uopće moglo detektirati.

7 Popis literature

1. Cortes M, Wong E, Koipally J, Georgopoulos K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. Current Opinion in Immunology. 1999;11(2):167-71.

2. Bigas A, Espinosa L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. Blood. 2012;119(14):3226-35.

3. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic Lymphocytic Leukemic B Cells But Not Normal B Cells Are Rescued From Apoptosis by Contact With Normal Bone Marrow Stromal Cells. Blood. 1998;91(7):2387-96.

4. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. Blood. 2009;113(4):856-65.

5. Kannan S, Sutphin RM, Hall MG, Golfman LS, Fang W, Nolo RM, et al. Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach. The Journal of Experimental Medicine. 2013;210(2):321-37.

6. Lobry C, Ntziachristos P, Ndiaye-Lobry D, Oh P, Cimmino L, Zhu N, et al. Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation. The Journal of Experimental Medicine. 2013;210(2):301-19.

7. Latchman DS. Transcription factors: An overview. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1997;29(12):1305-12.

8. Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends in biochemical sciences. 1996;21(9):327-35.

9. Pabo CO, Sauer RT. Protein-DNA Recognition. Annual Review of Biochemistry. 1984;53(1):293-321.

10. Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression. 1994;1218(2):129-35.

11. Alberts B, Johnson A, Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

12. Landschulz WH, Johnson PF , SL M. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science 1988;240(4860):1759-64.

13. Brennan RG, Matthews BW. The helix-turn-helix DNA binding motif. Journal of Biological Chemistry. 1989;264(4):1903-6.

14. Kodandapani R, Pio F, Ni C-Z, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, et al. A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.l ETS-domain-DNA complex. Nature. 1996;380(6573):456-60.

15. Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. Current Opinion in Structural Biology. 2001;11(1):39-46.

16. John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: Transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. Molecular Immunology. 2011;48(9–10):1272-8.

17. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. Nature Reviews Genetics. 2009;10(4):252-63.

18. Evans AG, Calvi LM. Notch signaling in the malignant bone marrow microenvironment: implications for a niche-based model of oncogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences. 2015;1335(1):63-77.

19. Murphy K, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 7th ed. New York: Garland Science; 2007.

20. Hagman J, Lukin K. Transcription factors drive B cell development. Current Opinion in Immunology. 2006;18(2):127-34.

21. Marecki S, McCarthy KM, Nikolajczyk BS. PU.1 as a chromatin accessibility factor for immunoglobulin genes. Molecular Immunology. 2004;40(10):723-31.

22. Horcher M, Souabni A, Busslinger M. Pax5/BSAP Maintains the Identity of B Cells in Late B Lymphopoiesis. Immunity. 2001;14(6):779-90.

23. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. Nature Reviews Immunology. 2005;5(6):497-508.

24. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. Molecular and Cellular Biology. 1994;14(3):1582-93.

25. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. Cell.117(5):663-76.

26. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang D-E. Transcription Factors, Normal Myeloid Development, and Leukemia. Blood. 1997;90(2):489-519.

27. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nature Reviews Immunology. 2007;7(2):105-17.

28. Schroeder T, Kohlhof H, Rieber N, Just U. Notch Signaling Induces Multilineage Myeloid Differentiation and Up-Regulates PU.1 Expression. The Journal of Immunology. 2003;170(11):5538-48.

29. Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE, Wallace DL, Rucker RB, Mejia LA, et al. Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. The American Journal of Clinical Nutrition. 1978;31(5):876-85.

30. Kakizuka A, Miller Jr WH, Umesono K, Warrell Jr RP, Frankel SR, Murty VVVS, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARα with a novel putative transcription factor, PML. Cell. 1991;66(4):663-74.

31. Asou N. All-trans Retinoic Acid in the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. Internal Medicine. 2007;46(2):91-4.

32. Saeed S, Logie C, Stunnenberg HG, Martens JHA. Genome-wide functions of PML-RAR[alpha] in acute promyelocytic leukaemia. British Journal of Cancer. 2011;104(4):554-8.

33. Mueller BU, Pabst T, Fos J, Petkovic V, Fey MF, Asou N, et al. ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. Blood. 2006;107(8):3330-8.

34. Alcalay M, Meani N, Gelmetti V, Fantozzi A, Fagioli M, Orleth A, et al. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. Journal of Clinical Investigation. 2003;112(11):1751-61.

35. Farokhzad OC, Shelley CS, Arnaout MA. Induction of the CD11b gene during activation of the monocytic cell line U937 requires a novel nuclear factor MS-2. The Journal of Immunology. 1996;157(12):5597-605.

36. Datta R, Yoshinaga K, Kaneki M, Pandey P, Kufe D. Phorbol Ester-induced Generation of Reactive Oxygen Species Is Protein Kinase Cβ-dependent and Required for SAPK Activation. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(52):41000-3.

37. White SL, Belov L, Barber N, Hodgkin PD, Christopherson RI. Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1α,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. Leukemia Research. 2005;29(10):1141-51.

38. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. Science. 1999;284(5415):770-6.

39. Mohr OL. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. Genetics. 1919;4(3):275-82.

40. Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky AV, Degnan BM, et al. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. BMC Evolutionary Biology. 2009;9:249.

41. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, et al. TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell. 1991;66(4):649-61.

42. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. Journal of Cell Science. 2008;121(19):3109-19.

43. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng Z-y. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. Protein Science. 2004;13(6):1435-48.

44. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, et al. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-Jκ/Su(H). Current Biology. 1995;5(12):1416-23.

45. Nam Y, Weng AP, Aster JC, Blacklow SC. Structural Requirements for Assembly of the CSL·Intracellular Notch1·Mastermind-like 1 Transcriptional Activation Complex. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(23):21232-9.

46. Lai EC. Protein Degradation: Four E3s For The Notch Pathway. Current Biology. 2002;12(2):R74-R8.

47. Lamar E, Deblandre G, Wettstein D, Gawantka V, Pollet N, Niehrs C, et al. Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. Genes & Development. 2001;15(15):1885-99.

48. Kopan R, Ilagan MXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. Cell. 2009;137(2):216-33.

49. Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, et al. Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination. Immunity. 1999;11(3):299-308.

50. Maillard I, Tu L, Sambandam A, Yashiro-Ohtani Y, Millholland J, Keeshan K, et al. The requirement for Notch signaling at the β-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre–T cell receptor. The Journal of Experimental Medicine. 2006;203(10):2239-45.

51. D'Altri T, Gonzalez J, Aifantis I, Espinosa L, Bigas A. Hes1 expression and CYLD repression are essential events downstream of Notch1 in T-cell leukemia. Cell Cycle. 2011;10(7):1031-6.

52. Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2012;23(4):450-7.

53. Turnpenny PD, Alman B, Cornier AS, Giampietro PF, Offiah A, Tassy O, et al. Abnormal vertebral segmentation and the notch signaling pathway in man. Developmental Dynamics. 2007;236(6):1456-74.

54. South AP, Cho RJ, Aster JC. The double-edged sword of Notch signaling in cancer. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2012;23(4):458-64.

55. Weng A, Ferrando A, Lee W, Morris Jt, Silverman L, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science. 2004;306:269 - 71.

56. Robinson DR, Kalyana-Sundaram S, Wu Y-M, Shankar S, Cao X, Ateeq B, et al. Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer. Nature Medicine. 2011;17(12):1646-51.

57. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. Nature Genetics. 2003;33(3):416 - 21.

58. Viatour P, Ehmer U, Saddic LA, Dorrell C, Andersen JB, Lin C, et al. Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. The Journal of Experimental Medicine. 2011;208(10):1963-76.

59. Proweller A, Tu L, Lepore JJ, Cheng L, Lu MM, Seykora J, et al. Impaired Notch Signaling Promotes De novo Squamous Cell Carcinoma Formation. Cancer Research. 2006;66(15):7438-44.

60. Yan M, Callahan CA, Beyer JC, Allamneni KP, Zhang G, Ridgway JB, et al. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. Nature. 2010;463(7282):E6-E7.

61. Liu Z, Turkoz A, Jackson EN, Corbo JC, Engelbach JA, Garbow JR, et al. Notch1 loss of heterozygosity causes vascular tumors and lethal hemorrhage in mice. The Journal of Clinical Investigation. 2011;121(2):800-8.

62. Curry CL, Reed LL, Nickoloff BJ, Miele L, Foreman KE. Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells. Laboratory Investigation. 2006;86(8):842-52.

63. Ingram WJ, McCue KI, Tran TH, Hallahan AR, Wainwright BJ. Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. Oncogene. 2007;27(10):1489-500.

64. Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. Experimental Cell Research. 2005;306(2):343-8.

65. Paroush Ze, Finley Jr RL, Kidd T, Wainwright SM, Ingham PW, Brent R, et al. Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. Cell. 1994;79(5):805-15.

66. Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor Groucho in Drosophila development. Genes & Development. 1999;13(17):2218-30.

67. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-

regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. Genes & Development. 1995;9(24):3136-48.

68. Sang L, Roberts JM, Coller HA. Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. Trends in Molecular Medicine. 2010;16(1):17-26.

69. Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S. Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development. 1995;121(8):2633-44.

70. Liu W-H, Lai M-Z. Deltex Regulates T-Cell Activation by Targeted Degradation of Active MEKK1. Molecular and Cellular Biology. 2005;25(4):1367-78.

71. Molnár A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. Molecular and Cellular Biology. 1994;14(12):8292-303.

72. John LB, Yoong S, Ward AC. Evolution of the Ikaros Gene Family: Implications for the Origins of Adaptive Immunity. The Journal of Immunology. 2009;182(8):4792-9.

73. Georgopoulos K, Moore D, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. Science. 1992;258(5083):808-12.

74. Klug CA, Morrison SJ, Masek M, Hahm K, Smale ST, Weissman IL. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95(2):657-62.

75. Molnár A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, et al. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. The Journal of Immunology. 1996;156(2):585-92.

76. Agoston DV, Szemes M, Dobi A, Palkovits M, Georgopoulos K, Gyorgy A, et al. Ikaros is expressed in developing striatal neurons and involved in enkephalinergic differentiation. Journal of Neurochemistry. 2007;102(6):1805-16.

77. Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, Boix-Chornet M, Fraga MF, Ropero S, et al. Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. Journal of Cell Science. 2007;120(15):2619-30.

78. Joshi I, Yoshida T, Jena N, Qi X, Zhang J, Van Etten RA, et al. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. Nature Immunology. 2014;15(3):294-304.

79. Schjerven H, McLaughlin J, Arenzana TL, Frietze S, Cheng D, Wadsworth SE, et al. Selective regulation of lymphopoiesis and leukemogenesis by individual zinc fingers of Ikaros. Nature Immunology. 2013;14(10):1073-83.

80. Perdomo J, Holmes M, Chong B, Crossley M. Eos and Pegasus, Two Members of the Ikaros Family of Proteins with Distinct DNA Binding Activities. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(49):38347-54.

81. Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. The EMBO Journal. 1996;15(19):5359-69.

82. Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. Cell-Autonomous Defects in Dendritic Cell Populations of Ikaros Mutant Mice Point to a Developmental Relationship with the Lymphoid Lineage. Immunity. 1997;7(4):483-92.

83. Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. Cell. 1995;83(2):289-99.

84. Wang JH. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. Immunity. 1996;5:537-49.

85. Bottardi S, Ross J, Bourgoin V, Fotouhi-Ardakani N, Affar EB, Trudel M, et al. Ikaros and GATA-1 Combinatorial Effect Is Required for Silencing of Human γ-Globin Genes. Molecular and Cellular Biology. 2009;29(6):1526-37.

86. Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merkenschlager M, Fisher AG. Association of Transcriptionally Silent Genes with Ikaros Complexes at Centromeric Heterochromatin. Cell.91(6):845-54.

87. Zhang J, Jackson AF, Naito T, Dose M, Seavitt J, Liu F, et al. Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. Nature Immunology. 2012;13(1):86-94.

88. Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, et al. Ikaros DNA-Binding Proteins Direct Formation of Chromatin Remodeling Complexes in Lymphocytes. Immunity. 1999;10(3):345-55.

89. Yoshida T, Yao-Ming Ng S, Zuniga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. Nature Immunology. 2006;7(4):382-91.

90. Chari S, Winandy S. Ikaros Regulates Notch Target Gene Expression in Developing Thymocytes. The Journal of Immunology. 2008;181(9):6265-74.

91. Kathrein, Sheila C, Winandy S. Ikaros Directly Represses the Notch Target Gene Hes1 in a Leukemia T Cell Line. The Journal of Biological Chemistry. 2008; 283(16):10476-84.

92. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic Lymphocytic Leukemia. New England Journal of Medicine. 2005;352(8):804-15.

93. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que T, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia. 1994;8(10):1640-5.

94. Hashimoto S, Dono M, Wakai M, Allen SL, Lichtman SM, Schulman P, et al. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. The Journal of Experimental Medicine. 1995;181(4):1507-17.

95. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. Blood. 2008;111(12):5446-56.

96. Binet J, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer. 1981;48(1):198-206.

97. Rai K, Sawitsky A, Cronkite E, Chanana A, Levy R, Pasternack B. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia1975 1975-08-01 00:00:00. 219-34 p.

98. Jakšić B, B. V. Total tumour mass score (TTM): a new parameter in chronic lymphocyte leukaemia. British Journal of Haematology. 1981;49(3):405-13.

99. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. Cancer Cell. 2011;20(2):246-59.

100. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood. 2011;117(6):1781-91.

101. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J, et al. Multiple Distinct Sets of Stereotyped Antigen Receptors Indicate a Role for Antigen in Promoting Chronic Lymphocytic Leukemia. The Journal of Experimental Medicine. 2004;200(4):519-25.

102. Buggins AGS, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia Research. 2010;34(7):837-42.

103. Billot K, Soeur J, Chereau F, Arrouss I, Merle-Béral H, Huang M, et al. Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. Blood. 2011;117(6):1917-27.

104. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature Medicine. 1997;3(7):730-7.

105. Pollyea DA, Gutman JA, Gore L, Smith CA, Jordan CT. Targeting acute myeloid leukemia stem cells: a review and principles for the development of clinical trials. Haematologica. 2014;99(8):1277-84.

106. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, et al. Acute Myeloid Leukemia. Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2012;10(8):984-1021.

107. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. British Journal of Haematology. 1976;33(4):451-8.

108. Licht JD, Sternberg DW. The Molecular Pathology of Acute Myeloid Leukemia. ASH Education Program Book. 2005;2005(1):137-42.

109. Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. The Journal of Experimental Medicine. 2011;208(10):1931-5.

110. Puente XS, PInyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature. 2011;475(7354):101-5.

111. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabanian H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. The Journal of Experimental Medicine. 2011;208(7):1389-401.

112. Hajdu M, Sebestyén A, Barna G, Reiniger L, Jánosi J, Sréter L, et al. Activity of the Notch-signalling Pathway in Circulating Human Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells. Scandinavian Journal of Immunology. 2007;65(3):271-5.

113. Kamdje AHN, Bassi G, Pacelli L, Malpeli G, Amati E, Nichele I, et al. Role of stromal cell-mediated Notch signaling in CLL resistance to chemotherapy. Blood Cancer Journal. 2012;2(5):e73.

114. Ji J, Vijayaragavan K, Bosse M, Weisel K, Bhatia M. OP9 Stroma Augments Survival of Hematopoietic Precursors and Progenitors During Hematopoietic Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells. 2008;26(10):2485-95.

115. Hubmann R, Hilgarth M, Schnabl S, Ponath E, Reiter M, Demirtas D, et al. Gliotoxin is a potent NOTCH2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells. British Journal of Haematology. 2013;160(5):618-29.

116. Zhang J, Ma D, Ye J, Zang S, Lu F, Yang M, et al. Prognostic impact of delta-like ligand 4 and Notch1 in acute myeloid leukemia. Oncology Reports. 2012;28(4):1503-11.

117. Tohda S, Kogoshi H, Murakami N, Sakano S, Nara N. Diverse effects of the Notch ligands Jagged1 and Delta1 on the growth and differentiation of primary acute myeloblastic leukemia cells. Experimental Hematology. 2005;33(5):558-63.

118. Groth C, Fortini ME. Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: Current challenges and future prospects. Seminars in Cell & Developmental Biology. 2012;23(4):465-72.

119. Geimer Le Lay A-S, Oravecz A, Mastio J, Jung C, Marchal P, Ebel C, et al. The Tumor Suppressor Ikaros Shapes the Repertoire of Notch Target Genes in T Cells. Science Signaling. 2014;7(317):ra28.

120. M T Witkowski LC, Y Hu, T Trimarchi, H Tagoh, M D McKenzie, S A Best, L Tuohey, T A Willson, S L Nutt, M Busslinger, I Aifantis, G K Smyth and R A Dickins. Activated Notch counteracts Ikaros tumor suppression in mouse and human T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2015(ePub).

121. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). Blood. 1991;77(5):1080-6.

122. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. Blood. 1979;54(3):713-33.

123. Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. The Journal of Experimental Medicine. 1976;143(6):1528-33.

124. Minowada J, Koshiba, H., Janossy, G., Greaves, M. F., Bollum, F. J. A Philadelphia chromosome positive human leukaemia cell line (NALM-1) with pre-B characteristics. Leukemia research. 1979.;3(4):261-6.

125. Minowada J, Ohnuma T, Moore GE. Rosette-Forming Human Lymphoid Cell Lines. I. Establishment and Evidence for Origin of Thymus-Derived Lymphocytes. Journal of the National Cancer Institute. 1972;49(3):891-5.

126. Schneider U, Schwenk H-U, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. International Journal of Cancer. 1977;19(5):621-6.

127. Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S, Nishikawa S. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. Experimental Hematology. 1994;22(10):979-84.

128. Holmes R, Zúñiga-Pflücker JC. The OP9-DL1 System: Generation of T-Lymphocytes from Embryonic or Hematopoietic Stem Cells In Vitro. Cold Spring Harbor Protocols. 2009;2009(2):pdb.prot5156.

129. Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells by Delta-like-1 In Vitro. Immunity. 2002;17(6):749-56.

130. Carlyle JR, Michie AM, Furlonger C, Nakano T, Lenardo MJ, Paige CJ, et al. Identification of a Novel Developmental Stage Marking Lineage Commitment of Progenitor Thymocytes. The Journal of Experimental Medicine. 1997;186(2):173-82.

131. Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T. Delta-induced Notch Signaling Mediated by RBP-J Inhibits MyoD Expression and Myogenesis. Journal of Biological Chemistry. 1999;274(11):7238-44.

132. Gao J, Yan X-L, Li R, Liu Y, He W, Sun S, et al. Characterization of OP9 as authentic mesenchymal stem cell line. Journal of Genetics and Genomics. 2010;37(7):475-82.

133. McCoy JJP. Handling, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. Current Protocols in Cytometry: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.

134. Batinic D, Rnjak L, Dubravcic K. Flow cytometry in hematology. Paediatria Croatica. 2006;50(Supl 1):176-82.

135. Galanzha EI, Zharov VP. Photoacoustic flow cytometry. Methods. 2012;57(3):280-96.

136. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir E-aD, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. Science. 2011;332(6030):687-96.

137. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72(1–2):248-54.

138. Matulic M, Skelin J, Radic-Kristo D, Kardum-Skelin I, Grcevic D, Antica M. Notch affects the prodifferentiating effect of retinoic acid and PMA on leukemic cells. Cytometry Part A. 2015;87(2):129-36.

139. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry. 1987;162(1):156-9.

140. Peixoto A, Monteiro M, Rocha B, Veiga-Fernandes H. Quantification of Multiple Gene Expression in Individual Cells. Genom research. 2004;14 (10a):1938-47.

141. Engels WR. Contributing software to the internet: the amplify program. Trends in biochemical sciences. 1993;18(11):448-50.

142. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 2012;13(1):1-11.

143. Monteiro M, Evaristo C, Legrand A, Nicoletti A, Rocha B. Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7 subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. Blood. 2007;109(7):2863-70.

144. Longobardi Givan A. Flow Cytometry: First Principles, Second Edition. New York: Wiley-Liss, Inc.; 2001.

145. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology. 2002;3(7):research0034.1 - research.11.

146. Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, et al. Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2014;28(6):1216-26.

147. Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. The Journal of Experimental Medicine. 2007;204(8):1825-35.

148. Chattopadhyay PK, Gierahn TM, Roederer M, Love JC. Single-cell technologies for monitoring immune systems. Nature Immunology. 2014;15(2):128-35.

149. Walter U, Franzke A, Sarukhan A, Zober C, von Boehmer H, Buer J, et al. Monitoring gene expression of TNFR family members by β-cells during development of autoimmune diabetes. European Journal of Immunology. 2000;30(4):1224-32.

150. Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. Blood. 2005;106(12):3898-906.

151. Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U. The Notch signaling pathway: Molecular basis of cell context dependency. European Journal of Cell Biology. 2011;90(6–7):572-81.

152. Hajdu M, Kopper L, Sebestyén A. Notch-Regulation upon Dll4-Stimulation of TGFb-Induced Apoptosis and Gene Expression in Human B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. Scandinavian Journal of Immunology. 2010;71(1):29-37.

153. Kannan S, Fang W, Song G, Mullighan CG, Hammitt R, McMurray J, et al. Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type–specific mechanism for tumor suppression. Blood. 2011;117(10):2891-900.

154. Hubmann R, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Duechler M, Dettke M, et al. Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2002;99(10):3742-7.

155. Kamdje AHN, Krampera M. Notch signaling in acute lymphoblastic leukemia: any role for stromal microenvironment? Blood. 2011;118(25):6506-14.

156. Li L, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, et al. The Human Homolog of Rat Jagged1Expressed by Marrow Stroma Inhibits Differentiation of 32D Cells through Interaction with Notch1. Immunity. 1998;8(1):43-55.

157. Masuya M, Katayama N, Hoshino N, Nishikawa H, Sakano S, Araki H, et al. The Soluble Notch Ligand, Jagged-1, Inhibits Proliferation of CD34+ Macrophage Progenitors. Int J Hematol. 2002;75(3):269-76.

158. Schroeder T, Just U. Notch signalling via rbp-j promotes myeloid differentiation. Experimental Hematology. 2000;28(12):1496.

159. Murata-Ohsawa M, Tohda S, Nara N. Cellular analysis of growth suppression induced by the Notch ligands, Delta-1 and Jagged-1 in two myeloid leukemia cell lines. International Journal of Molecular Medicine. 2004;14(2):223-6.

160. Li G-H, Fan Y-Z, Liu X-W, Zhang B-F, Yin D-D, He F, et al. Notch signaling maintains proliferation and survival of the HL60 human promyelocytic leukemia cell line and promotes the phosphorylation of the Rb protein. Molecular and Cellular Biochemistry. 2010;340(1):7-14.

161. Reineke EL, Liu H, Lam M, Liu Y, Kao H-Y. Aberrant Association of Promyelocytic Leukemia Protein-Retinoic Acid Receptor-α with Coactivators Contributes to Its Ability to Regulate Gene Expression. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(25):18584-96.

162. Ng APP, Nin DS, Fong JH, Venkataraman D, Chen C-S, Khan M. Therapeutic targeting of nuclear receptor corepressor misfolding in acute promyelocytic leukemia cells with genistein. Molecular Cancer Therapeutics. 2007;6(8):2240-8.

163. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. The Journal of Immunology. 1983;130(4):1910-7.

164. Li Y, Said F, Gallagher R. Retinoic acid-resistant HL-60 cells exclusively contain mutant retinoic acid receptor-alpha. 1994;83(11):3298-302.

165. Gallagher RE. Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. Leukemia. 2002;16(10):1940-58.

166. Bunce CM, Wallington LA, Harrison P, Williams GR, G. B. Treatment of HL60 cells with various combinations of retinoids and 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 results in

differentiation towards neutrophils or monocytes or a failure to differentiate and apoptosis. Leukemia. 1995;9(3):410-8.

167. Jasek E, Mirecka J, JA L. Effect of differentiating agents (all-trans retinoic acid and phorbol 12-myristate 13-acetate) on drug sensitivity of HL60 and NB4 cells in vitro. Folia Histochemica et Cytobiologica. 2008;46(3):323-30.

8 Prilog A

8.1 Utjecaj puta dojavljivanja Notch na diferencijaciju stanica hematopoeze

8.1.1 Detekcija reaktivnih kisikovih radikala

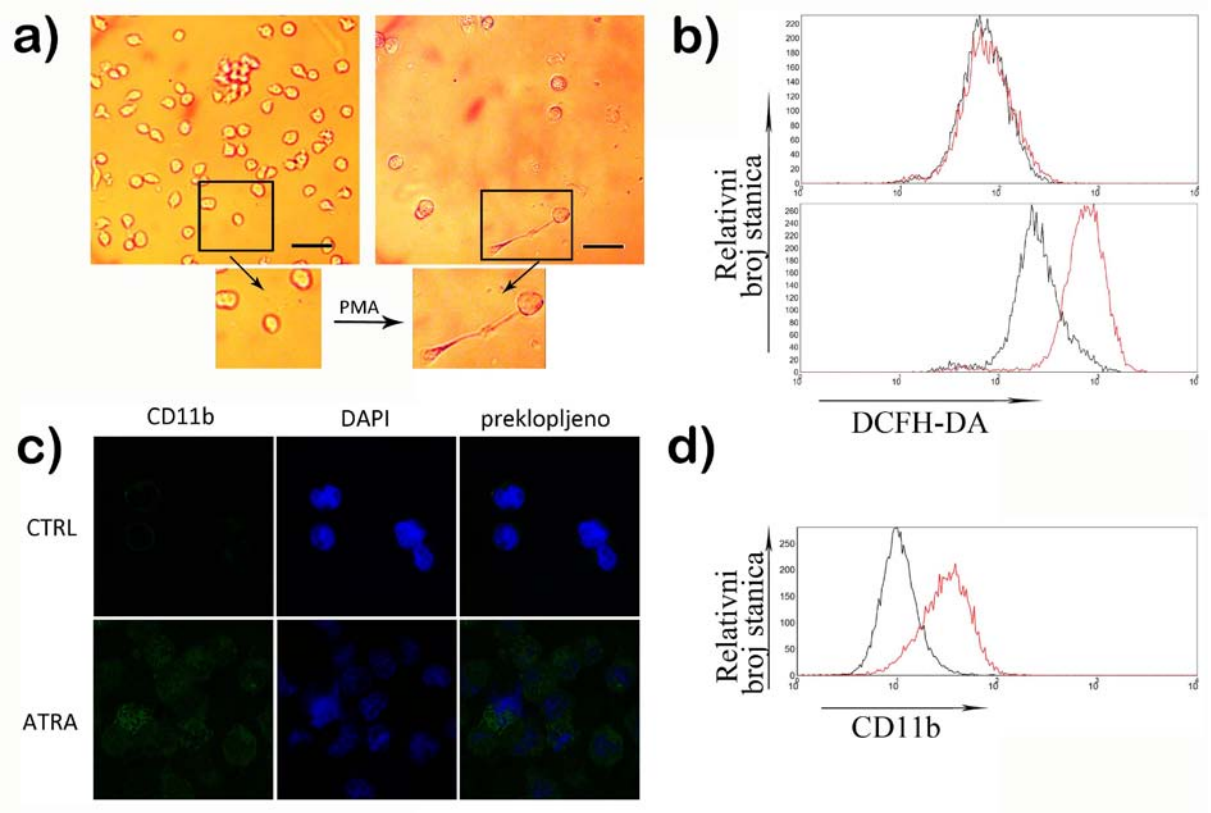
Stvaranje reaktivnih kisikovih radikala (ROS, eng. Reactive oxygen species) pratili smo putem fluorescentnog agensa DCFH-DA (eng. dichlorofluorescein diacetate) (163). Osnova reakcije je cijepanje acetatnih grupa od strane staničnih esteraza pri čemu dolazi do oksidacije te se nefluorescentni DCFH-DA pretvara u fluorescentni diklorofluorescein (DCF). Reagens DCFH-DA (Life technologies, Molecular probes) koristili smo prema sljedećem protokolu: $2x10^6$ stanica HL-60 resuspendiranih u 2 ml PBS inkubirali smo s DCFH-DA (tri minute u tamnom prostoru pri 37°C, završna koncentracija 0,3 µM). Potom smo uzorke razdijelili na dva jednaka dijela te smo u 1 ml stanične suspenzije dodali agens PMA (završna koncentracija 80ng/ml), dok je drugi, neizloženi, uzorak stanične suspenzije poslužio kao kontrola. Za isključivanje mrtvih stanica, u svaku epruvetu je dodan propidij jodid. Aktivnost stvaranja kisikovih radikala izmjerili smo protočnim citometrom u nekoliko navrata u određenim vremenskim intervalima.

8.1.2 Konfokalna mikroskopija

Za analizu konfokalnim mikroskopom stanice smo vezali na suha pokrovna stakalca (15mmx15mm), prethodno izložena 0,01% otopinom poly-L-lizina. Oko $3,5x10^5$ stanica otopljenih u 100 µl PBS-a inkubirali smo na površini pokrovnog stakalca petnaest minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja nadtaloga na stanice smo dodali protutijelo CD11b FITC i inkubirali dvadeset minuta pri +4°C. Nakon tri serije ispiranja PBS-om, uzorke smo fiksirali petnaest minuta pri sobnoj temperaturi, dodavanjem 2%-tne otopine paraformaldehida (100 µl po uzorku). Uzorke smo isprali tri puta u PBS-u i dodali medij za optakanje (Tablica 3.2). Pri analizi uzoraka korišten je konfokalni mikroskop tvrtke Leica Microsystems (Heidelberg, Njemačka).

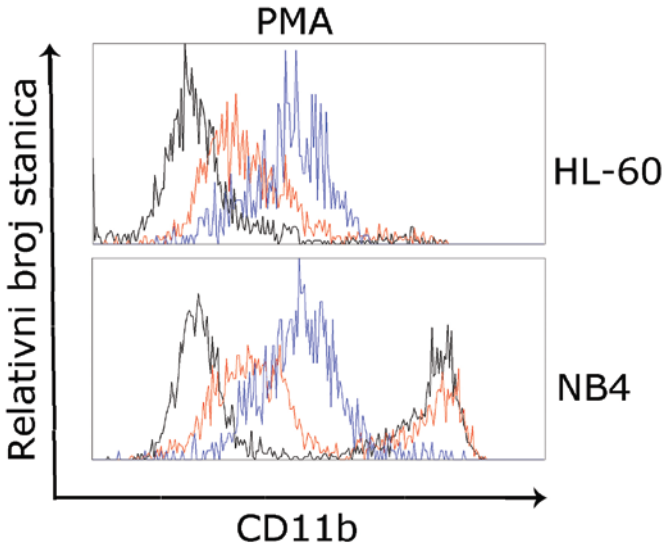
8.1.3 Rezultati

Za diferencijaciju stanica hematopoeze koristili smo OP9 sustav osovljavanja nezrelih k diferenciranim stanicama. Prilikom istraživanja potvrdili smo diferencijaciju loza stanica nakon izlaganja agensima PMA ili ATRA. S obzirom na mogućnost pojave otpornosti na navedene agense (164, 165), loze stanica smo prethodno provjerili. Slika 8.1 prikazuje praćenje morfoloških promjena, mjerenje oksidativnog stresa te ekspresije površinskog biljega CD11b konfokalnim mikroskopom te protočnim citometrom. Diferencijacija potaknuta ATRA-om, ovisno o koncentraciji, usmjerava preteče stanica k neutrofilnoj, odnosno monocitnoj lozi (166). Otprije je poznato kako pri procesu diferencijacije potaknute s PMA ili ATRA loze stanica HL-60 i NB4 mijenjaju i vlastitu morfologiju (167). Na Slici 8.1c prikazali smo snimku konfokalnog mikroskopa nakon pet dana diferencijacije s ATRA, pri čemu je vidljiva površinska lokalizacija biljega CD11b. Protein iz obitelji integrina CD11b, prisutan na različitim vrstama leukocita, korišten je kao pokazatelj diferencijacije loze stanica, što je vidljivo i na Slici 8.1d.



Slika 8.1 Ciljana diferencijacija loza stanica HL-60 pomoću PMA (a, b) te NB4 (c,d) putem reagensa ATRA. (a) Promjenu u morfologiji loze stanica HL-60 pratili smo svjetlosnim mikroskopom nakon stimulacije s PMA (završna konc. 80 ng/ml). (b) Diferencijaciju loze stanica HL-60 detekcijom pojave kisikovih radikala izazvanih stimulacijom s PMA (završna konc. 80ng/ml) pratili smo protočnim citometrom u dvije točke: prije dodavanja PMA te šezdeset minuta nakon dodavanja PMA (b, dolje). Diferencijacija loze stanica NB4 uz praćenje površinskog biljega CD11b nakon 24 sata stimulacije s retinoičnom kiselinom (1μM) te detekcijom putem (c) konfokalnog mikroskopa te (d) protočnog citometra.

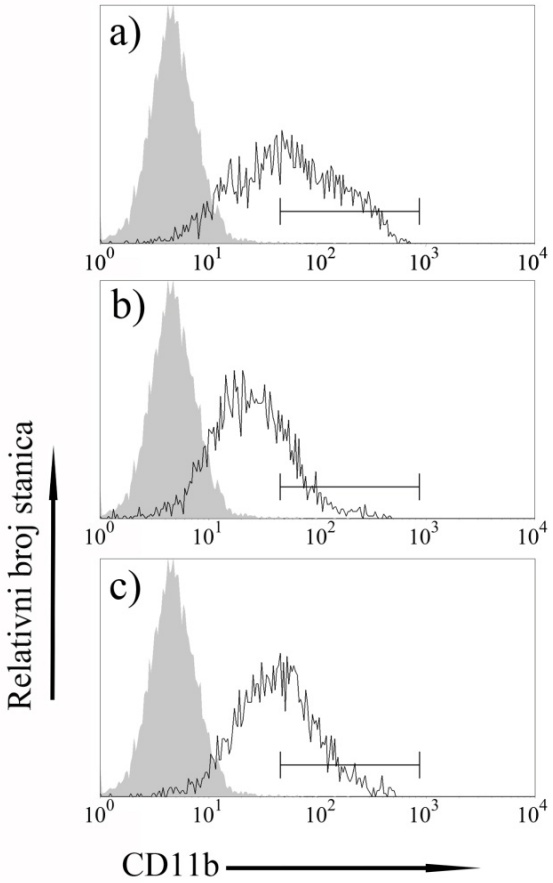
Nakon potvrđene ekspresije sastavnih čimbenika puta dojavljivanja Notch te optimizacije budućih lančanih reakcija polimerazom, napravili smo pokus upotrebom sustava stanica OP9. Loze stanica HL-60 te NB4 ciljano smo diferencirali uz pomoć PMA, uz zajednički uzgoj sa stanicama OP9 ili OP9-DL1. Nakon tri dana kokultivacije, analizom protočnim citometrom pokazali smo kako rast loza stanica HL-60 te NB4 na stanicama OP9-DL1 dovodi do smanjenja stupnja diferencijacije te slabije ekspresije površinskog biljega CD11b, što je vidljivo na Slici 8.2.



Slika 8.2 Analiza loza stanica NB4 te HL-60 protočnim citometrom te praćenje ekspresije površinskog biljega CD11b. Netretirane loze stanica uzgajane na stanicama OP9 prikazane su crnim histogramom, dok su tretirane loze stanica uzgajane na stanicama OP9 prikazane plavim histogramom. Tretirane loze stanica uzgajane na stanicama OP9-DL1 prikazane su crvenim histogramom. Populacija najjačeg intenziteta fluorescencije na svim histogramima predstavlja stanice OP9, odnosno OP9-DL1, koje zbog prisutnosti zelenog fluorescencijskog proteina imaju jak signal te ih je na temelju navedenog svojstva poprilično lagano ukloniti iz analize.

Smanjenje ekspresije površinskog biljega zapazili smo kod obiju loza stanica diferenciranih s PMA pri čemu ovaj rezultat upućuje na bitnu ulogu aktivacije puta dojavljivanja Notch prilikom inducirane diferencijacije hematopoetskih stanica. Ulogu puta dojavljivanja Notch dodatno smo potvrdili upotrebom inhibitora gama-sekretaze, DAPT, koji

onemogućuje daljnju aktivaciju i poticanje nizvodnih procesa puta dojavljivanja Notch (Slika 8.3). Loza stanica HL-60 uzgajana je tri dana zajedno s OP9 te OP9-DL1 stanicama u prisustvu PMA, s ili bez dodanih inhibitora puta dojavljivanja Notch (DAPT-završna konc. 5μM) (138).



Slika 8.3 Ogledni prikaz utjecaja puta dojavljivanja Notch1 na diferencijaciju loza stanica HL-60. Loza stanica HL-60 uzgajana je tri dana te ciljano diferencirana agensom PMA (otvoreni crni histogram). HL-60 stanice rasle su (a) bez ili u (b,c) prisustvu OP9-DL1 stanica. Inhibitor γ -sekretaza, DAPT, dodan je na početku pokusa (c) u optimalnoj, unaprijed određenoj koncentraciji (završna konc. 5μM). Promjene u ekspresiji površinskog biljega CD11b pratili smo protočnim citometrom. Inhibicija puta dojavljivanja Notch DAPT-om potaknula je povećanu ekspresiju CD11b prilikom diferencijacije loze stanica HL-60. Ispunjeni histogram predstavlja označene te netretirane stanice tijekom izvođenja pokusa. Preuzeto iz Matulić i sur. (138).

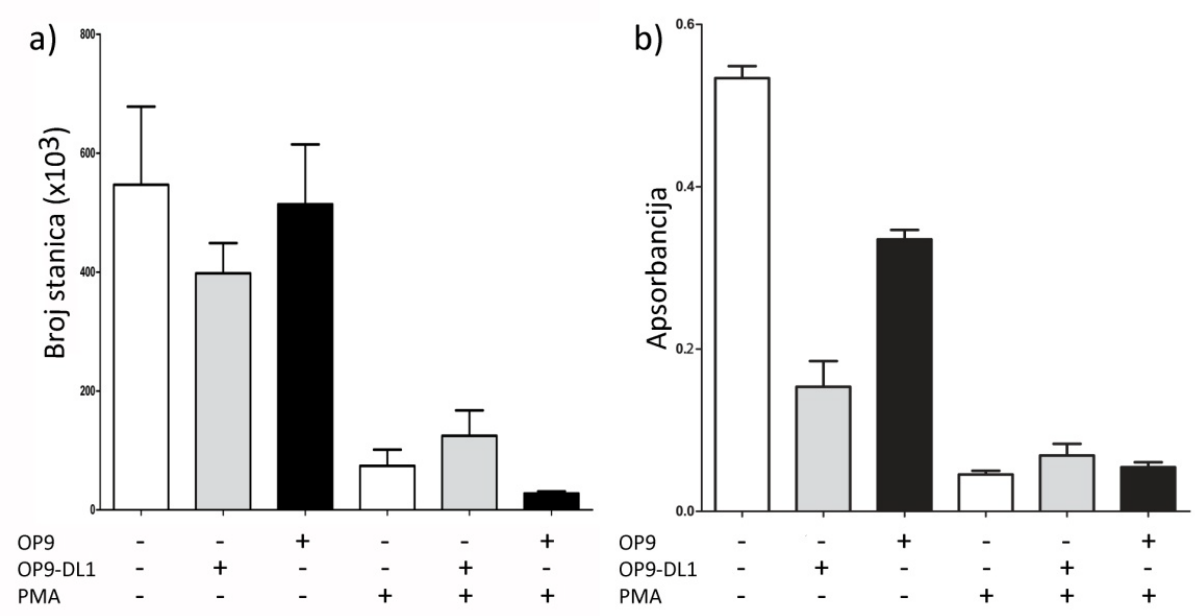
8.2 Učinak aktivacije puta dojavljivanja Notch na proliferaciju hematopoetskih stanica

8.2.1 Test proliferacije stanica WST-1

U sklopu istraživanja koristili smo kolorimetrijsku metodu mjerenja zasnovanu na kvantifikaciji stanične proliferacije. Otopina za mjerenje stanične proliferacije crvenkaste boje sadrži reagens WST-1 (Roche) te dodatni reagens u svrhu sparivanja elektrona. Spoj WST-1 spada u skupinu tetrazolijevih soli koje stanični enzimi, poput mitohondrijskih dehidrogenaza cijepaju u formazan. Porast broja stanica u ispitivanom uzorku dovodi do još veće ukupne aktivnosti mitohondrijskih dehidrogenaza pri čemu dolazi i do povećane koncentracije nastalog formazana, što je usporedivo s brojem metabolički aktivnih stanica u kulturi te je mjerljivo spektrofotometrijskom metodom. Test proliferacije stanica reagensom WST-1 izveli smo prema uputama proizvođača (Tablica 3.2). Za mjerenje proliferacije stanica pomiješali smo u pločicama s 96 bunarića 100 µl ispitivane suspenzije stanica te 10 µl reagensa WST-1 po svakom bunariću. Nakon miješanja, uzorke smo inkubirali dva sata pri temperaturi od 37°C te 5% CO_2 te smo potom mjerili apsorbanciju otopine unutar svakog bunarića. Svaki uzorak četverostrukom ponavaljanju te smo naknadno izračunali srednju vrijednost svih bunarića koji potječu od istog uzorka (138).

8.2.2 Rezultati

Utjecaj puta dojavljivanja Notch na proliferaciju stanica te na stanično preživljavanje pokazali smo na Slici 8.4. Stanice HL-60 inkubirali smo u prisustvu ili odsustvu diferencirajućeg agensa PMA te fibroblasnih stanica OP9 te OP9-DL1. Pokazali smo kako je kokultivacija HL-60 na OP9-DL1 stanicama inhibirala proliferaciju u usporedbi sa stanicama koje su rasle zajedno s fibroblastima OP9. Kod tih stanica se proliferacijski učinak nije znatno promijenio te su stanice kultivirane s fibroblastima OP9 proliferirale kao i stanice HL-60 koje su rasle u odsustvu fibroblasta. Također, prilikom uzgajanja stanica HL-60 u prisustvu PMA, nije bilo statistički značajne razlike (Mann Whitney test, $p< 0,05$) među stanicama inkubiranim na OP9 te OP9-DL1, no, čini se kako je razina proliferacije ipak viša u odnosu na HL-60 stanice rasle bez prisustva fibroblasta te one uzgajane na podlozi prekrivenoj OP9 fibroblastima. Slika pokazuje podatke dobivene putem tri neovisna eksperimenta. Očitanja tijekom WST-1 testa rađena su u četiri primjerka te je aritmetička sredina svakog uzorka korištena za daljnju analizu.



Slika 8.4 WST-1 proliferacijski test te praćenje staničnog preživljenja uz pomoć tripanskog modrila. Stanice HL-60 uzgajali smo tri dana bez ili u prisustvu PMA te su rasle samostalno ili u prisustvu OP9-DL1 ili OP9 stanica. Nakon tri dana stanice smo (a) izbrojali koristeći tripansko modrilo pri detekciji mrtvih stanica te smo napravili (b) proliferacijski test uz pomoć agensa WST-1. Preuzeto iz Matulić i sur. (138).

9 Prilog B

9.1 Popis kratica

ADAM- eng. A disintegrin and metalloprotease

AML- eng. Acute myeloid leukemia (Akutna mijeloidna leukemija)

ATRA- eng. All trans retinoic acid (Retinoična kiselina)

B-ALL- eng. B.cell acute lymphoblastic leukemia (Akutna leukemija limfoblasta B)

B-CLL- eng. B-cell chronic lymphocytic leukemia (Kronična leukemija limfocita B)

BCR- eng. B-cell receptor (Receptor limfocita B)

BSA- eng. Bovine serum albumine (goveđi serumski albumin)

C/EBPα- eng. CCAAT/enhancer binding protein

CBP- eng. CREB (cAMP response element-binding protein)-binding protein

CD- eng. Cluster of differentiation

CLP- eng. Common lymphoid progenitor (Zajednički preteča limfocita)

DAG- Diacilglicerol

DAPT- N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

DCFH-DA-eng. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat)

DNA- eng. Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonukleinska kiselina)

DR- eng. Direct repeats (Ponavljajući sljedovi)

EBF- eng. early B-cell factor (Rani čimbenik limfocita B)

EGF- eng. Epidermal growth factor (Epidermalni čimbenik rasta)

ELISA- eng. Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzimski imunološki test vezan na površinu)

FAB- Razredbovanje stupnjevitosti akutne leukemije nastalo suradnjom triju nacija: Francuske, Amerike te Velike Britanije.

GFI1- eng. Growth-factor independent 1

GFP- eng. Green fluorescent protein (Zeleni fluorescentni protein)

HD- eng. Heterodimerization domain

HDAC- eng. Histone deacetylase

HES- eng. Hairy enhancer of split

HMG- eng. High mobility group

HPRT- eng. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

HSC- eng. Hematopoietic stem cell (Hematopoetska stanica matice)

IgD- Imunoglobulin D

IgG- Imunoglobulin G

IGHV- eng. Immunoglobulin heavy chain variable region genes

IgM- Imunoglobulin M

IRF- eng. Interferon-regulatory factor (Čimbenik regulacije interferona)

IRF8- eng. Interferon-regulatory factor 8

JNK- eng. c-Jun N-terminal kinase

LEF1- eng. Lymphoyd- enhancer- binding factor 1 (Limfoidno-pojačivački vezujući čimbenik 1)

LNR- eng. LIN-12-Notch repeats

MAML1- eng. Mastermind like 1

MLP- eng. Multi-lineage progenitor cell (Multipotentna stanica preteča loza)

MNNL- eng. Module at the N-terminus of Notch ligands

NEXT- eng. Notch extracellular truncation

NF-κB- eng. Nuclear factor κB

NICD- eng. Notch intracellular domain (Unutarstanična domena Notch)

NRR- Negativna regulatorna regija receptora

NuRD- eng. Nucleosomal remodeling and histone deacetylase

OBF1- eng. OCT (octamer-binding transcription factor)-binding factor 1 (Oktamerni vezujući čimbenik 1)

PAX5- eng. Paired box protein 5

PEST- Slijed aminokiselina bogat prolinom (P), glutamatom (E), serinom (S) te treoninom (T)

PHSC- eng. Pluripotent hematopoietic stem cells (Pluripotentne krvotvorne matice stanica)

PKC- eng. Protein kinase C

PMA- eng. Phorbol 12-myristate 13-acetate

RARα- eng. Retinoic acid receptor alpha

RARE- eng. Retinoic acid response element

RBPj κ – eng. Recombining binding protein suppressor of hairless

RNA- eng. Ribonucleic acid (Ribonukleinska kiselina)

ROS- eng. Reactive oxigen species (Reaktivni kisikovi radikali)

RUNX1- eng. Runt-related transcription factor 1

RXRα- eng. Retinoid X receptor α

SDS PAGE- eng. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SEM- eng. Standard error of the mean (Standardna greška srednje vrijednosti)

snRNA- eng. Small nuclear RNA

TBP- eng. TATA binding protein

T-CLL- eng. T-cell chronic lymphocytic leukemia (Kronična leukemija limfocita T)

TCR- eng. T-cell receptor (Receptor limfocita T)

TTM- eng. Total tumor mass (ukupna masa tumora)

ZAP70- eng. Zeta associated protein 70

ΔCt- eng. Delta cycle threshold (Metoda razlike u ciklusima pri zadanom pragu očitavanja vrijednosti).

10 Životopis

Mladen Paradžik rođen je u Doboju, Bosna i Hercegovina 8. travnja 1983. godine. Tijekom Domovinskog rata s obitelji seli u Hrvatsku gdje završava osnovnu školu u Oroslavju te 2001. godine XII. Gimnaziju u Zagrebu. Akademske godine 2001/2002 upisuje studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, smjer molekularna biologija. Po završenom studiju započinje s volontiranjem na Institutu Ruđer Bošković te ubrzo dobiva posao znanstvenog novaka u Imunološkom zavodu, na projektu Modulacija funkcije ljudskih regulatornih limfocita T. 2009. Godine vraća se u svojstvu znanstvenog novaka na Institut Ruđer Bošković te se zapošljava na projektu „Molekularne interakcije pri diferencijaciji limfocita" pod vodstvom dr.sc. Mariastefanie Antice. Član je Međunarodnog imunološkog društva, Hrvatskog imunološkog društva te Hrvatskog društva za istraživanje raka. Dobitnik je stipendije Francuskog velesposlanstva u Zagrebu na temelju čega je dio istraživanja obavio u sklopu boravka na Institutu Necker (Pariz, Francuska), u laboratoriju dr.sc. Sophie Ezine. Tijekom dosadašnje znanstvene karijere sudjelovao je pri izradi četiri originalna znanstvena rada te participirao na devet znanstvenih skupova. Oženjen je i otac jednog djeteta, a u slobodno vrijeme bavi se rukometom na pijesku pri čemu je na temelju ostvarenih reprezentativnih rezultata ocijenjen od strane Hrvatskog olimpijskog odbora kao vrhunski sportaš prve kategorije. Dobitnik je medalje grada Zagreba 2009.

Objavljeni radovi:

- J Immunopathol Pharmacol. 2012 Oct-Dec; 25(4):893-900.

Ikaros family transcription factors expression in rat thymus: detection of impaired development.

P Paradzik M, Novak S, Mokrovic G, Bordukalo Niksic T, Heckel D, Stipic J, Pavicic Baldani D, Cicin-Sain L, Antica M.

- J Immunol Methods. 2010 Jul; 359(1-2**):**42-46.

Gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded lymph nodes.

Antica M, Paradzik M, Novak S, Dzebro S, Dominis M.

- Coll Antropol. 2010 Mar; 34(1):59-62.

Analysis of Ikaros family splicing variants in human hematopoietic lineages.

Matulić M, Paradzik M, Puskarić BJ, Stipić J, Antica M.

- Am J Hematol. 2009 Jun; 84(6):375-7.

Ikaros family transcription factors in chronic and acute leukemia.

Matulic M*, Paradzik M*, Cicin-Sain L, Kapitanovic S, Dubravcic K, Batinic D, Antica M.