Regulacija diferencijacije stanica akutne promijelocitne leukemije koštanim morfogenetskim proteinima

Topić Grahovac, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:759564

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Topić Grahovac, Iva (2013) ***Regulacija diferencijacije stanica akutne promijelocitne leukemije koštanim morfogenetskim proteinima [Effect of bone morphogenetic proteins on differentiation of human promyelocytic leukemia cells].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/2064

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Iva Topić Grahovac

Regulacija diferencijacije stanica akutne promijelocitne leukemije koštanim morfogenetskim proteinima

DISERTACIJA



Zagreb, 2013.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Iva Topić Grahovac

Regulacija diferencijacije stanica akutne promijelocitne leukemije koštanim morfogenetskim proteinima

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu imunologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga i Imunološkom laboratoriju Zavoda za fiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima znanstvenoistraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske 108-1080229-0142 (voditelj prof. dr. sc. Danka Grčević).

Voditelj rada: prof.dr.sc. Danka Grčević, dr. med.

Zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr.sc. Danki Grčević na nesebičnom prenošenju znanja i vještina, strpljenju, pomoći i savjetima kojima me vodila u izradi i pisanju ovoga rada.

Zahvaljujem se osobama koje su me zadužile svojom pomoći prof. dr. sc. Ani Marušić i Sanji Ivčević, bacc. med. lab. dg. Zahvaljujem se prijateljima i suradnicima iz laboratorija na pomoći i savjetima u svakodnevnom radu: dr. Marini Ikić, Katerini Zrinski-Petrović, med. lab. teh., dr.sc. Danieli Žitnjak, doc.dr.sc. Nataši Kovačić, prof.dr.sc. Vedranu Kataviću i doc.dr.sc. Ivanu Krešimiru Lukiću.

Zahvaljujem mojim roditeljima i sestri na moralnoj i financijskoj podršci tijekom čitavog školovanja.

I na kraju, hvala Gordanu i Lari na motivaciji, ljubavi i strpljenju.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1. STRUKTURA I FUNKCIJA KRVOTVORNOG SUSTAVA 1

1.1.2. Hematopoeza 5

1.2. BOLESTI KRVOTVORNOG SUSTAVA 9

1.2.1. Akutne leukemije 9

1.2.2. Podjela akutnih leukemija 12

1.2.3. Akutna promijelocitna leukemija 14

1.2.4. Liječenje akutne promijelocitne leukemije 18

1.3. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI 21

1.3.1. Djelovanje koštanih morfogenetskih proteina 26

1.4. STANIČNE LINIJE KAO MODELI AKUTNE PROMIJELOCITNE LEUKEMIJE 29

2. HIPOTEZE **32**

3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA **33**

4. MATERIJALI I METODE **34**

4.1. Stanične linije 34

4.2. Izazivanje, praćenje i procjena diferencijacije staničnih linija NB4 i HL60 potaknute ATRA-om 35
4.3. Obrada stanica sa koštanim morfogenetskim proteinima 35
4.4. Bolesnici 36
4.5. Morfološka analiza stanica – May-Grunwald Giemsa bojenje 38
4.6. Protočno-citometrijska analiza 38
4.7. Analiza genskog izražaja 40
4.8. Statistička analiza rezultata 45
5. REZULTATI 46
5.1. ATRA potiče diferencijaciju mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 46
5.2. Koštani morfogenetski proteini smanjuju diferencijaciju mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 potaknutu ATRA-om 61
5.3. Djelovanje molekula BMP-2 i NOGGIN-a na mijeloidne leukemijske linije NB4 i HL60 nakon obrade ATRA-om 70
5.4. Značajke bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije i izražaj molekularnog biljega PML/RARα 77
5.5. Obrazac i korelacija izražaja molekula BMP, diferencijacijskih i proliferacijskih gena u odnosu na izražaj molekularnog biljega bolesti u koštanoj srži bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije 80
6. RASPRAVA 85
6.1. ATRA potiče diferencijaciju stanica akutne promijelocitne leukemije 85
6.2. Djelovanje molekula BMP na hematopoetske stanice 89
6.3. Koštani morfogenetski proteini koče diferencijaciju stanica akutne promijelocitne leukemije potaknutu ATRA-om 90

6.4. Međudjelovanje signalnih puteva ATRA-e i molekula BMP 95

6.5. Izražaj onkogena PML/RARα pozitivno korelira s izražajem gena za molekule BMP i ID u bolesnika oboljelih od akutne promijelocitne leukemije 96

7. ZAKLJUČCI **99**

8. SAŽETAK **101**

9. SUMMARY **103**

10. LITERATURA **105**

11. ŽIVOTOPIS **119**

POPIS KRATICA

ActR – aktivinski receptor ((prema engl. *activin receptor)*

AIDA – protokol za liječenje akutne promijelocitne leukemije *AIDA* (prema engl. *all-trans retinoic acid and idarubicin*)

Alk – aktivinu slična kinaza (prema engl. *activin like kinase*)

ALL – akutna limfatična leukemija

AML – akutna mijeloidna leukemija

AP-1060 - stanična linija mijeloidne leukemije AP-1060

APL – akutna promijelocitna leukemija

Asb2 – gen Asb2 (prema engl. *ankyrin repeat and SOCS box protein*)

ATRA – *all-trans* retinoična kiselina (prema engl. *all-trans retinoic acid*)

BAMBI – gen BAMBI (prema engl. *bone morphogenetic and activin membrane-bound inhibitor*)

Bcl-2 – gen Bcl-2 (prema engl. *B-cell lymphoma)*

BM – koštana srž (prema engl. *bone marrow*)

BMP – koštani morfogenetski protein (prema engl. *bone morphogenetic protein*)

BMPR – BMP receptor (prema engl. *bone morphogenetic protein receptor*)

C/EBP – gen C/EBP (prema engl. *CCAAT-enhancer-binding-proteins*)

c-fms – gen koji kodira receptor za čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (prema engl. *receptor for the macrophage colony-stimulating factor gene)*

c-Kit – tirozin protein kinazni Kit onkogen (prema engl. *tyrosine-protein kinase Kit oncogene*)

Dlx – gen Dlx (prema engl. *distal-less homebox*)

EKG – elektrokardiogram

FAB – francusko-američko-britanska

FITC – fluorescentna boja fluorescein izotiocijanat

GAPDH – gliceraldehid 3 fosfat dehidrogenaza (prema engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GM-CSF –čimbenik poticanja granulocitno makrofagnih kolonija (prema engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*)

G-SCF - čimbenik poticanja granulocitnih kolonija (prema engl. *granulocyte colony stimulating factor*)

HL60 stanična linija mijeloblstične leukemije HL-60

HLH – skupina HLH proteina (prema engl. *helix-loop.helix*)

H-ras – onkogen Harvey Ras (prema engl. *Harvey rat sarcoma viral oncogene*)

HT93 - stanična linija mijeloidne leukemije HT93

ID – gen ID (prema engl. *DNA binding inhibitor*)

IL - interleukin

K-ras - onkogen Kirsten Ras (prema engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*)

M-CSF – čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (prema engl. *macrophage colony stimulating factor*)

NB4- stanična linija akutne promijelocitne leukemije NB4

NK – NK stanice (prema engl. *natural killer*)

NOG – molekula NOGGIN

NPM – gen NPM (prema engl. *nucleophosmin*)

N-ras – onkogen neuroblastoma Ras (prema engl. *neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene*)

NuMA – gen NuMA (prema engl. *nuclear mitotic apparatus protein 1*)

PBL – periferna krv (prema engl. *peripheral blood*)

PBS – fosfatna puferirana otopina (prema engl. *phosphate buffered saline*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (prema engl. *polymerase chain reaction*)

PE - fluorescentna boja fikoeritrin (prema engl. *phycoerithrin*)

PI – propidij jodid (prema engl. *propidium iodide*)

PL-21 – stanična linija mijeloidne leukemije PL-21

PLZF – gen PLZF (prema engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*)

PML – gen promijelocitne leukemije

PML/RARα - gen promijelocitne leukemije/ receptor retinoične kiseline α (prema engl. promyelocytic leukemia/retinoid acid receptor *α*)

PU.1 – gen za transkripcijski čimbenik PU.1

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze (prema engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

RA - retinoična kiselina (prema engl. *retinoic acid*)

RAR – receptor retinoične kiseline (prema engl. *retinoid acid receptor*)

RARα – receptor retinoične kiseline α (prema engl. retinoid acid receptor *α*)

RPMI – medij RPMI (prema engl. *Roswell Park Memorial Institute*)

RXR – receptor retinoične kiseline X (prema engl. *retinoid X receptor*)

SCF – čimbenik matične stanice (prema engl. *stem cell factor*)

SMAD – molekula SMAD (prema engl. *small mothers against decapentaplegic*)

STAT5B – gen STAT5B (prema engl. *signal transducer and activator of transcription*)

TGF – transformirajući čimbenik rasta (prema engl. *transforming growth factor*)

UBE2D3 – gen UBE2D3 (prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme 2D3*)

UF-1 - stanična linija mijeloidne leukemije UF-1

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (prema engl. *vascular endotel growth factor*)

1. UVOD

Sazrijevanje krvotvornih stanica regulirano je brojnim citokinima, čimbenicima poticanja kolonija, tkivnim čimbenicima rasta i hormonima. Njihovo je međudjelovanje vrlo složen proces koji je usklađen s potrebama organizma i važan za održavanje homeostaze hematopoetskog i imunološkog sustava. Poremećaji tog međudjelovanja dio su patofiziologije brojnih hematoloških, imunoloških, metaboličkih, koštanih i endokrinih bolesti.

1.1. Struktura i funkcija krvotvornog sustava

Uloga krvotvornog (hematopoetskog) sustava je stvaranje krvotvornih stanica. Čine ga organi i tkiva u kojima sazrijevaju krvne stanice tijekom procesa koji se naziva hematopoeza. To je sustav koji čini funkcionalnu, ali ne i anatomsku cjelinu. Tijekom embrionalnoga razvoja hematopoeza se odvija u žumanjčanoj vrećici, jetri, slezeni i koštanoj srži (1). U odraslom organizmu razlikujemo dvije vrste tkiva u kojima se odvija proces hematopoeze: mijeloidno tkivo (crvena koštana srž dugih kostiju, rebara, prsne kosti, tijela kralježaka i kostiju lubanje) i limfoidno tkivo (uz koštanu srž i limfni čvorovi, tonzile, slezena i timus) (1). Tako se proces hematopoeze može podijeliti u procese imunopoeze kojim nastaju limfociti i plazma stanice te procese mijelopoeze kojim nastaju eritrociti, granulociti, monociti/makrofagi i trombociti (Slika 1). Limfne organe i tkiva možemo podijeliti u primarne (timus i koštana srž) i sekundarne (limfni čvorovi, slezena i limfno tkivo pridruženo sluznicama).

Timus je organ u kojem sazrijevaju limfociti T. Najveći je u fetalnome razdoblju, a nakon 10. godine života naglo involuira. Timus se dijeli na režnjiće koji se sastoje od kore bogate

limfocitima i srži koja je siromašna limfocitima. Između limfocita nalaze se epitelne stanice, dendritične stanice i makrofagi koji zajedno s vezivom čine stromu timusa (2).

Koštanu srž čini vezivno tkivo koje se nalazi u medularnoj šupljini kostiju. Sastoji se od stromalnih stanica (masne stanice, mezenhimalne stromalne stanice, endotelne stanice, makrofagi) među koje su uklopljene krvne stanice (2). Stromalne stanice zajedno s limfocitima T i makrofagima proizvode čimbenike rasta nužne za razvoj i diferencijaciju svih krvotvornih loza. Razlikujemo crvenu aktivnu koštanu srž u kojoj nastaju i sazrijevaju krvne stanice te žutu inaktivnu koštanu srž koja se sastoji poglavito od masnih stanica. Tijekom starenja organizma smanjuje se udio crvene koštane srži i povećava udio žute (1). U stanjima povećane potrebe za stvaranjem krvnih stanica proširuje se crvena koštana srž u područje žute. U nekim patološkim stanjima, primjerice mijelofibrozi, proizvodnja krvnih stanica odvija se osim u koštanoj srži i u drugim organima i tkivima primjerice jetri, slezeni i limfnim čvorovima (3). Taj se proces stvaranja krvnih stanica izvan koštane srži naziva ekstramedularna hematopoeza. Osim u patološkim stanjima, proces ekstramedularne hematopoeze može se odvijati i tijekom imunološkog odgovora na različite patogene. Tako u slezeni i jetri sazrijevaju predočne stanice i fagociti (3). U koštanoj srži nalaze se nezrele stanice koje susljednim procesima proliferacije i diferencijacije sazrijevaju u funkcionalne stanice pojedinih hematopoetskih loza (Slika 1) (4, 5). Najnezrelija stanica u koštanoj srži, iz koje nastaju funkcionalne zrele krvne stanice svih loza, naziva se pluripotentna matična stanica (HSC, prema engl. *hematopoietic stem cell*). Najveći udio koštane srži čine različiti stadiji nezrelih progenitorskih hematopoetskih stanica koje su morfološki i fenotipski prepoznatljive jer izražavaju značajke pojedinih hematopoetskih loza (Slike 1 i 2).

Limfni čvorovi smješteni su uzduž limfnih žila. Limfa prolazi izravno kroz limfni čvor i ovdje započinje imunosni odogovor na antigene koje iz međustaničnih prostora donosi limfa. U kori limfnog čvora nalaze se limfociti, dendritične stanice i makrofagi koji okružuju sinuse krvnih i limfnih žila. U srži se nalaze makrofagi i plazma stanice. Protok krvi i limfe kroz limfni čvor omogućuje susret naivnih limfocita i antigena. S limfom dolaze dendritične stanice koje su vezale antigen, ali i slobodni antigeni. Te antigene hvataju i prerađuju dendritične stanice, makrofagi i limfociti B te ih predočuju limfocitima T. Ako dođe do susreta antigena i specifičnog limfocita T započinje imunosni odgovor. Ako limfociti T ne naiđu na tuđe antigene, eferentnim limfnim žilama odlaze prema torakalnom duktusu, a potom u vensku cirkulaciju (2).

Slezena reagira na antigene koji u nju dolaze iz krvi. Okružuje ju kapsula građena od gustog vezivnoga tkiva. U medijalnom dijelu slezene nalazi se hilus koji sadrži krvne žile, živce i limfne žile. Središnji dio slezene sačinjava pulpa. Razlikujemo *crvenu pulpu* i *bijelu pulpu*. U *crvenoj pulpi* se nalaze eritrociti, makrofagi, dendritične i plazma-stanice. Tu se odvija fagocitoza i uklanjaju oštećeni eritrociti, mikroorganizmi i druge čestice. U *bijeloj pulpi* se nalaze nakupine limfocita T. Nakon antigenske stimulacije na rubovima tih nakupina pojavljuju se limfociti B (2). U slezeni se odvija imunoreakcija na antigene koji se nalaze u krvi, a sama slezena služi kao filtar za krv. Odstranjuje intracelularne inkluzije poput ostataka jezgre u eritrocitima, siderotične granule, sferocite te eritrocite i trombocite obložene antitijelima (6). U slezeni se zadržavaju i trombociti i granulociti koji se, kada je to potrebno, novače u cirkulaciju (6).

Limfno tkivo pridruženo sluznicama za razliku od jetre i slezene nema ovojnicu i nalazi se u stijenci probavnog, dišnog i spolno-mokraćnog sustava. Smješteno je u sluznici ili neposredno ispod nje. Neka od tih tkiva su dobro organizirana poput tonzila i Peyerovih ploča, dok se druga sastoje od manje-više difuznih nakupina ili pojedinačnih stanica u sluznicama (2).

Na hematopoetski sustav snažno djeluju različita zbivanja u organizmu. Tako primjerice infekcija, osim lokalnih promjena u zahvaćenom organu, izaziva reakciju hematopoetskog sustava što opažamo u vidu promjena u broju krvnih stanica i diferencijalnoj krvnoj slici. Zloćudni tumori djeluju na hematopoetski sustav, i to tako da smanjuju broj hematopoetskih stanica zbog toksičnog učinka nekroze ili izravno potiskuju koštanu srž zbog metastaza u kostima (7). Hematopoetski sustav može također biti i primarno mjesto nastanka zloćudnih bolesti hematopoetskih stanica, prije svega leukemija.

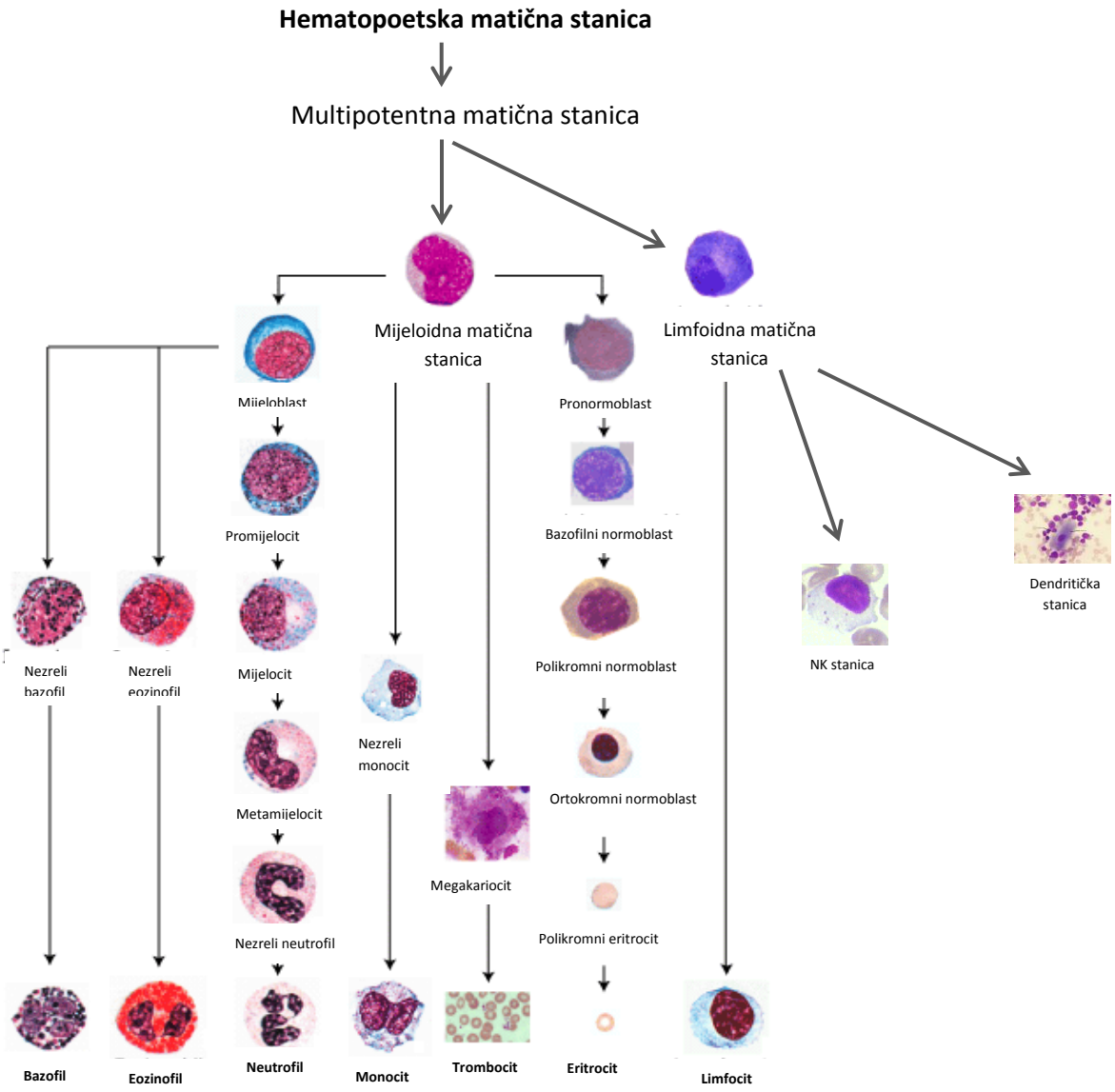
1.1.2. Hematopoeza

Hematopoeza je proces stvaranja krvnih stanica. Sve krvne stanice nastaju iz hematopoetske matične stanice. U zdrave, odrasle osobe, dnevno nastane oko 10^{12} novih krvnih stanica (8). Taj je proces ključan za održavanje homeostaze broja krvnih stanica u perifernoj cirkulaciji.

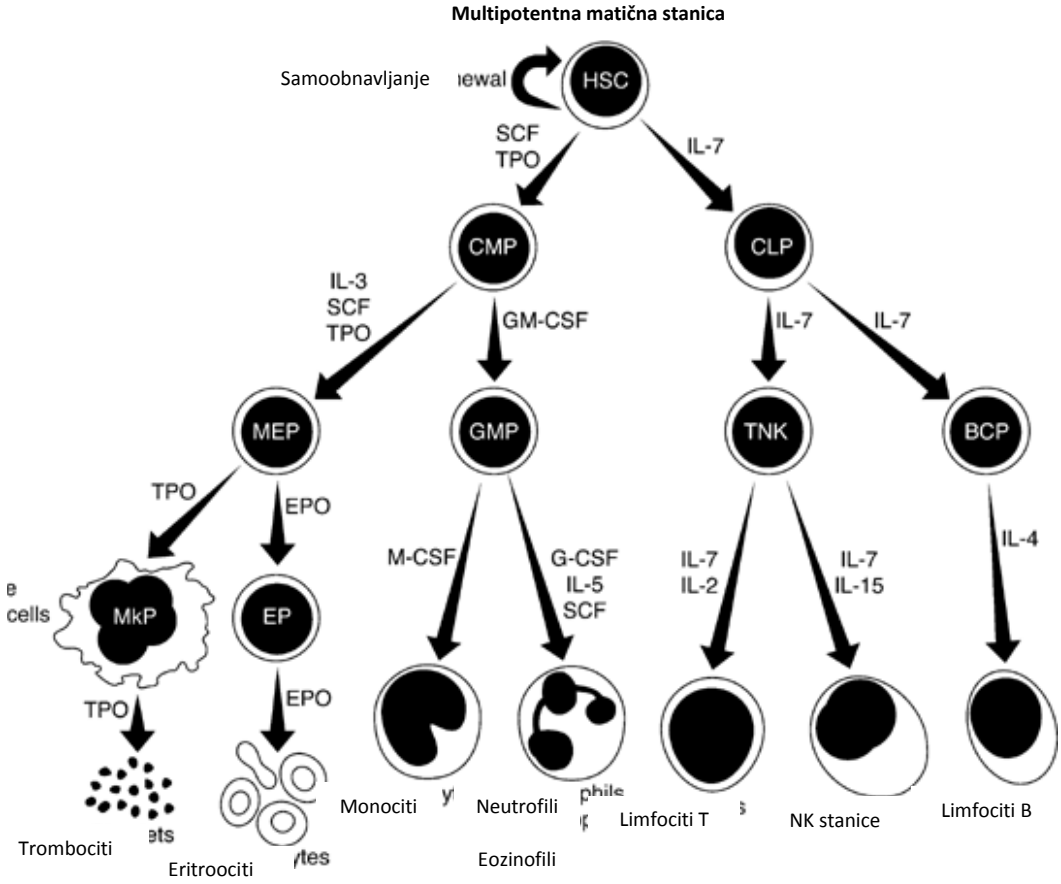
Hematopoetska matična stanica nastaje u koštanoj srži i ima sposobnost diferencijacije u sve loze zrelih krvnih stanica (Slike 1 i 2). Ovisno o potrebama organizma i stimulaciji faktorima rasta, hematopoetska matična stanica najprije se usmjerava u nezrelu stanicu mijelopoetske ili limfopoetske loze i na kraju diferencira u jednu od staničnih loza (9). Na temelju izražaja membranskih biljega, koji poglavito pripadaju CD (prema engl. *cluster of differentiation*)-klasifikaciji molekula, možemo odrediti razvojni stadij i staničnu lozu pojedine progenitorske stanice. Tako iz mijeloidnog progenitora nastaju preteče granulocita i monocita/makrofaga te megakariocita i eritrocita (10). Iz limfoidnog progenitora nastaju limfociti T i B te NK (prema engl. *natural killer*) i dendritične stanice (11) (Slika 2). Hematopoetska matična stanica također ima mogućnost samoobnavljanja (12). Neke od njenih stanica kćeri ostaju u stadiju multipotentne hematopoetske matične stanice, tako da se broj matičnih stanica održava razmjerno stalnim tijekom života.

U koju će se lozu matična stanica diferencirati prije svega ovisi o čimbenicima rasta s kojima dolazi u doticaj. Ti su čimbenici rasta poglavito citokini skupine čimbenika poticanja kolonija i interleukini te neki hormoni, kemokini i tkivni čimbenici rasta. Oni usmjeravaju diferencijaciju nezrelih hematopoetskih stanica u odgovarajuću hematopoetsku lozu (Slika 2). Tako je, primjerice, eritropoetin važan za stvaranje eritrocita (13), čimbenik matične stanice (SCF, prema

engl. *stem cell factor*) važan je za razvoj hematopoetske matične stanice, čimbenik poticanja granulocitnih kolonija (G-SCF, prema engl. *granulocyte colony stimulating factor*) potiče razvoj matičnih stanica i granulocita (14), interleukin 3 (IL-3) potiče diferencijaciju multipotentne hematopoetske matične stanice u mijeloidnu progenitorsku stanicu, a potom stimulira i sve stanice mijeloidne loze. Interleukin 7 (IL-7) potiče diferencijaciju multipotentne hematopoetske matične stanice u limfoidnu progenitorsku stanicu te potiče diferencijaciju svih limfoidnih loza (limfocita B, limfocita T, NK-stanica) (15). Čimbenik poticanja granulocitnih i makrofagnih kolonija (GM-CSF, prema engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) potiče stvaranje granulocita, monocita/makrofaga i dendritičkih stanica (16), a čimbenik poticanja makrofaga (M-CSF, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*) potiče rast makrofaga i monocita, a nužan je i za diferencijaciju osteoklasta (17). Čimbenici rasta djeluju poglavito lokalno na mjestu stvaranja, ali se, posebice u nekim patološkim stanjima, mogu naći i kao cirkulirajući u krvnom optoku. Sve čimbenike rasta, osim eritropoetina koji se stvara u bubregu, luče poglavito stanice strome koštane srži te uz njih limfociti T, monociti, endotelne stanice i fibroblasti. Na ciljnim stanicama nalaze se specifični receptori putem kojih čimbenici rasta djeluju, a koji ujedno služe i kao specifični biljezi pojedinih hematopoetskih loza (18). U današnje vrijeme u liječenju bolesnika za potrebe poticanja rasta određenih vrsta stanica koriste se farmaceutski pripravci eritropoetina, G-CSF-a i GM-CSF-a (19).



Slika 1. Shematski prikaz loza ljudskih hematopoetskih stanica. Iz hematopoetske matične stanice nastaju mijeloidna i limfoidna matična stanica te daljnim sazrijevanjem druge zrele stanice hematopoetske loze. Iz mijeloidne matične stanice nastaju bazofili, eozinofili, neutrofili, monociti, trombociti i eritrociti, dok iz limfoidne matične stanice nastaju limfociti i NK (prema engl. *natural killer*)-stanice. Različite podvrste dendritičkih stanica mogu nastati iz mijeloidne i limfoidne loze. *Modificirano prema: Dr. Thompson: Anatomy & Physiology 2020 Exam Reviews.*



Slika 2. Čimbenici koji potiču rast loza krvnih stanica. Iz multipotentne matične stanice (HSC, prema engl. *hematopoietic stem cell*) nastaju zajednički mijeloidni (CMP, prema engl. *common myeloid progenitor*) i zajednički limfoidni (CLP, prema engl. *common lymphoid progenitor*) progenitor, a iz njih ostale stanice mijeloidne, odnosno limfoidne loze. Prikazani su čimbenici koji usmjeravaju ili potiču razvoj određene krvne stanice. Tako su čimbenici poticanja makrofagnih kolonija M-CSF (M-CSF, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*) odnosno granulocitnih kolonija G-CSF (prema engl. *granulocyte colony stimulating factor*) potrebni za razvoj granulocita, odnosno monocita/makrofaga. Eritropoetin (EPO) nužan je za nastanak ertitrocita, a trombopoetin (TPO) za razvoj trombocita. Za razvoj limfocita nužni su interleukin (IL)-2, -4, -7, -15. Čimbenik matične stanice (SCF, prema engl. *stem cell factor*), megakariocitno-eritrocitni progenitor (MEP), megakariocitni progenitor (MkP), eritrocitni progenitor (EP), granulocitno-makrofagni progenitor (GMP), progenitor limfocita T i NK stanica (TNK, prema engl. *T-cell natural killer cell progenitor*), progenitor limfocita B (BCP, prema engl. *B-cell progenitor*). *Modificirano prema: Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. Oncogene. 2007;26:6715-23.*

1.2. BOLESTI KRVOTVORNOG SUSTAVA

Bolesti krvotvornog sustava možemo podijeliti u poremećaje crvenih krvnih stanica, bijelih krvnih stanica i bolesti sustava za zgrušavanje krvi. Najčešći poremećaj crvenih krvnih stanica je anemija, odnosno smanjeni broj eritrocita ili hemoglobina. Najčešća bolest bijelih krvnih stanica uzrokovana je njihovom zloćudnom alteracijom. Često su poremećaji ovih loza povezani te se poremećaji homeostaze jedne loze krvnih stanica mogu odraziti i na druge krvne loze.

1.2.1. Akutne leukemije

Akutna leukemija je sindrom klonalne zloćudne bolesti hematopoetske matične stanice. Ako se ne liječi, završava smrću zbog nedostatne funkcije hematopoetskog sustava unutar 3-6 mjeseci (20). Akutna leukemija je najčešća zloćudna bolest dječje dobi. Podjednako zahvaća žene i muškarce, a godišnje se javlja u Hrvatskoj oko 10 slučajeva novooboljelih od leukemija na 100 000 stanovnika (21).

Leukemija nastaje zbog poremećaja genoma unutar jedna matične hematopoetske stanice. Diobom te stanice nastaju istovjetne zloćudne stanice koje svojim rastom potiskuju zdrave stanice hematopoetskog sustava. Kada takva novonastala populacija postane dovoljno brojna, nastaje klinički prepoznatljiva bolest (22).

Smatra se da zloćudna bolest može nastati kao posljedica poremećaja u funkciji staničnih onkogena koji reguliraju sintezu bjelančevina uključenih u procese stanične proliferacije, preživljenja i diferencijacije (20). Onkogeni se dijele u četiri skupine: 1. izvanstanični čimbenici rasta poput čimbenika rasta trombocitnog podrijetla, 2. membranski čimbenici rasta, primjerice

receptori c–fms (receptor za M-CSF) i c-kit (receptor za SCF), 3. unutarstanični prijenosnici signala (N-ras, H-ras, K-ras) i 4. transkripcijski čimbenici koji u staničnoj jezgri reguliraju procese prepisivanja DNA i staničnu diobu (20). Osim onkogena za nastanak zloćudnih tumora važni su i tumor-supresorski geni. Oni reguliraju prijelaz iz G1-faze staničnog ciklusa u S-fazu te napredovanje stanica kroz S-fazu u G2-fazu staničnog ciklusa i mitozu. Gubitak njihove funkcije delecijom ili mutacijom uzrokuje nastanak zloćudne bolesti. Osobe koje naslijede manjak tumor-supresorskog gena pokazuju predispoziciju za razvoj tumora. Tako primjerice, osobe sa nedostatkom BRCA (prema engl. *breast cancer*) 1 i 2 gena imaju sklonost nastanku karcinoma dojke i jajnika (23), a osobe s nedostatkom APC (prema engl. *adenomatous polyposis coli*) i DCC (prema engl. *deleted in colon cancer*) gena sklonost nastanku karcinoma debeloga crijeva (24, 25). Osim genetske podloge u nastanku leukemija važnu ulogu imaju virusi, nasljedne i stečene bolesti, ozračenje ionizirajućim zračenjem i kemijske tvari.

Važno je istaknuti da je za nastanak maligne bolesti potrebno više poremećaja unutar jednog onkogena ili poremećaj funkcije više onkogena i tumor supresorskih gena da bi se razvio tumor. Mehanizmi aktivacije onkogena su kromosomske translokacije, točkaste mutacije, inaktivacije i amplifikacije gena (20). Takvi genetski poremećaji dovode do toga da stanice leukemijskog klona nikad ne sazrijevaju nego ostaju na razini blasta ili promijelocita. Nekontroliranim rastom leukemijski klon potiskuje normalne hematopoetske stanice, a sam ne stvara zrele funkcionalne stanice.

Klinička slika u bolesnika koji boluju od akutnih leukemija posljedica je rasta malignog klona leukemijskih stanica kao i nedostatne funkcije normalnog hematopoetskog sustava, toksičnog djelovanja citostatske terapije i metaboličkih komplikacija (26). Predilekcijska mjesta za bujanje zloćudnog leukemijskog klona su osim koštane srži i jetra, slezena i limfni čvorovi. Zbog velikog

broja leukemijskih stanica pojavljuju se krvarenja i leukemijski trombi u malim krvnim žilama, a zbog nedostatne funkcije hematopoetskog sustava nastaju infekcije. U nekih vrsta akutnih leukemija (poglavito akutna promijelocitna leukemija, APL) pojavljuje se u ranoj fazi diseminirana intravaskularna koagulacija (27) kao posljedica povećanih koncentracija prokoagulantnih tkivnih i tumorskih čimbenika (28). Od metaboličkih komplikacija javljaju se hiperuricemija i urična nefropatija koja može napredovati prema akutnom zatajenju bubrega.

Za postavljanje dijagnoze leukemije potrebno je dokazati postojanje leukemijskog klona stanica u perifernoj krvi te bujanje tih stanica u koštanoj srži. Dijagnostički postupak uključuje nalaz kompletne krvne slike, razmaza periferne krvi te biopsije koštane srži. Citogenetskom analizom potrebno je dokazati i prisutnost nekih genetskih anomalija kako bi se odredio podtip leukemije.

Liječenje akutnih leukemija možemo podijeliti u dvije osnovne faze: uvodnu terapiju i terapiju u remisiji akutnih leukemija. Uvodna terapija služi za postizanje potpune remisije bolesti koja se određuje redukcijom leukemijskih stanica u koštanoj srži uz oporavak krvne slike. Također, uvodnom terapijom nastoji se postići i nestanak svih znakova tumorskog infiltrativnog procesa. Uvodna terapija i terapija u remisiji podrazumijeva istodobnu primjenu više citostatika, najčešće antraciklinskih kemoterapeutika, citarabina, clofarabina, vinkristina, metotreksata i sl. Novije terapijske strategije uključuju i primjenu monoklonskih protutijela kako bi se sprječio rast malignih stanica. To je primjerice gemtuzumab (anti-CD33) koji se koristi u liječenju mijeloidnih leukemija (29). U nekim vrstama leukemija, primjerice APL, primjenjuje se diferencijacijska terapija kojom se postiže terminalna diferencijacija malignih promijelocita u granulocite. Postupak presađivanja matičnih hematopoetskih stanica jedan je od vrlo učinkovitih načina liječenja pojedinih vrsta leukemija, poglavito u mlađih bolesnika. Tijekom liječenja primijenjuju se i različiti oblici suportivne terapije kojom se potiče rast određenih vrsta stanica,

primjerice granulocita pomoću čimbenika rasta poput G-CSF (filgastrim) ili GM-CSF (sargramostim), ili se nadoknađuju određene stanice i time sprječavaju infekcije, nastanak anemije ili krvarenje.

1.2.2. Podjela akutnih leukemija

Podjela akutnih leukemija temelji se na morfološkim značajkama leukemijskih stanica. Uz morfološku podjelu u kliničkom radu koristi se citokemijska, imunološka, citogenetička i molekularna podjela. Citomorfološka podjela predložena je od grupe francusko-američko-britanskih (FAB) autora i nazvana je FAB-klasifikacija. Prema toj klasifikaciji postoji osam podtipova akutnih mijeloidnih leukemija (AML) (Tablica 1) (30). Za klasifikaciju akutnih limfoidnih leukemija (ALL) koristi se klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine (31) (Tablica 2).

Tablica 1. Podjela akutnih mijeloidnih leukemija prema FAB-klasifikaciji.

Tip leukemije	**Naziv**	Najčešće citogenetičke promjene
AML-M0	AML minimalno diferencirana	
AML-M1	AML bez sazrijevanja	del(5), del(7), +8
AML-M2	AML sa sazrijevanjem	t(8;21), t(6;9)
AML-M3	Akutna promijelocitna leukemija	t(15;17)
AML-M4	Akutna mijelomonocitna leukemija	inv(16), del(16), t(16;16), t(4;11)
AML-M5	Akutna monocitna leukemija	t(9;11), t(10;11)
AML-M6	Akutna eritroleukemija	
AML-M7	Akutna megakariocitna leukemija	

Tablica 2. Podjela akutnih limfoidnih leukemija prema klasifikaciji SZO.

B limfoblastična leukemija/limfom
B limfoblastična leukemija/limfom, NOS (prema engl. *not otherwise specified*)
B limfoblastična leukemija/limfom s ponavljanim genetičkim poremećajima
B limfoblastična leukemija/limfom s t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
B limfoblastična leukemija/limfom s t(v;11q23); MLL preraspodjela
B limfoblastična leukemija/limfom s t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
B limfoblastična leukemija/limfom s hiperdiploidijom
B limfoblastična leukemija/limfom s hipodiploidijom (hipodiploidna ALL)
B limfoblastična leukemija/limfom s t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH
B limfoblastična leukemija/limfom s t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1(TCF3-PBX1)
T limfoblastična leukemija/limfom

Današnjim dijagnostičkim pristupom koji se temelji na citomorfologiji, imunofenotipizaciji i citogenetici dokazano je postojanje tzv. hibridnih leukemija. To su bifenotipske leukemije koje imaju značajke i limfoidne i mijeloidne loze, odnosno stanice leukemijskog klona izražavaju biljege i limfoidne i mijeloidne loze (32).

1.2.3. Akutna promijelocitna leukemija

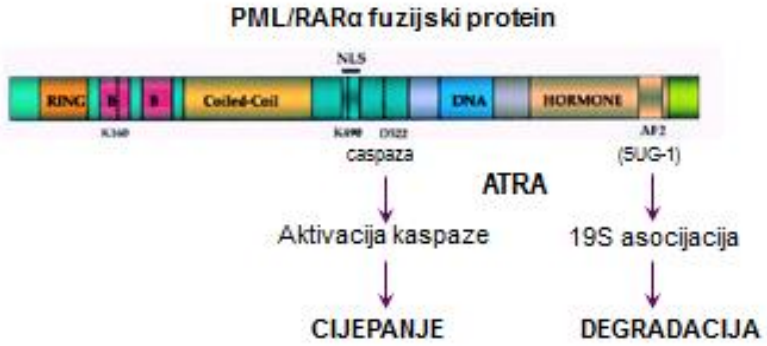
Akutnu promijelocitnu leukemiju, kao podtip akutne mijeloidne leukemije, prvi je puta opisao 1957. godine Leif Hillestad (33). Prema FAB-klasifikaciji označava se kao podtip AML-M3 (34). Osnovne značajke APL-e su abnormalno nakupljanje malignih promijelocita koji se ne diferenciraju u zrele granulocite, prisutnost translokacije t(15;17) te pojava diseminirane intravaskularne koagulacije (35). APL čini oko 5% slučajeva akutnih mijeloidnih leukemija. Svake godine dijagnosticira se nekoliko tisuća novih slučajeva te leukemije u svijetu. Prema Hrvatskom registru za rak u 2010. godini ustanovljeno je 200 novih bolesnika oboljelih od akutne mijeloidne leukemije (36) te otprilike 2-3 novooboljela od APL u Hrvatskoj godišnje.

U više od 95% bolesnika oboljelih od APL stanice leukemijskog klona nose translokaciju t(15;17), koja rezultira spajanjem gena za retinoidni receptor α (RARα, prema engl. *retinoid acid receptor α*) na kromosomu 17q21 i gena promijelocitne leukemije (PML, prema engl. *promyelocytic leukemia*) na kromosomu 15q22 (37-39). Tako nastali fuzijski onkogen PML/RARα kodira sintezu onkoproteina PML/RARα koji sprječava aktivaciju ciljnih gena retinoične kiseline potrebnih za normalnu diferencijaciju promijelocita u granulocite (Slika 3) (35, 40, 41). Prisutnost tog fuzijskog transkripta omogućava postavljanje dijagnoze i predstavlja molekularni biljeg za utvrđivanje minimalne rezidualne, odnosno rekurirajuće bolesti (42). Osim opisane, postoje i genetske varijante u kojima nastaje fuzija RARα s drugim genima, primjerice PLZF (prema engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*), NPM (prema engl. *nucleophosmin*), STAT5B (prema engl. *signal transducer and activator of transcription*) ili NuMA (prema engl. *nuclear mitotic apparatus protein 1*) (43). Prepoznavanje tih genetskih varijanti je važno klinički i prognostički jer ti oblici APL ne odgovaraju na isti način na diferencijacijsku terapiju *all-trans*

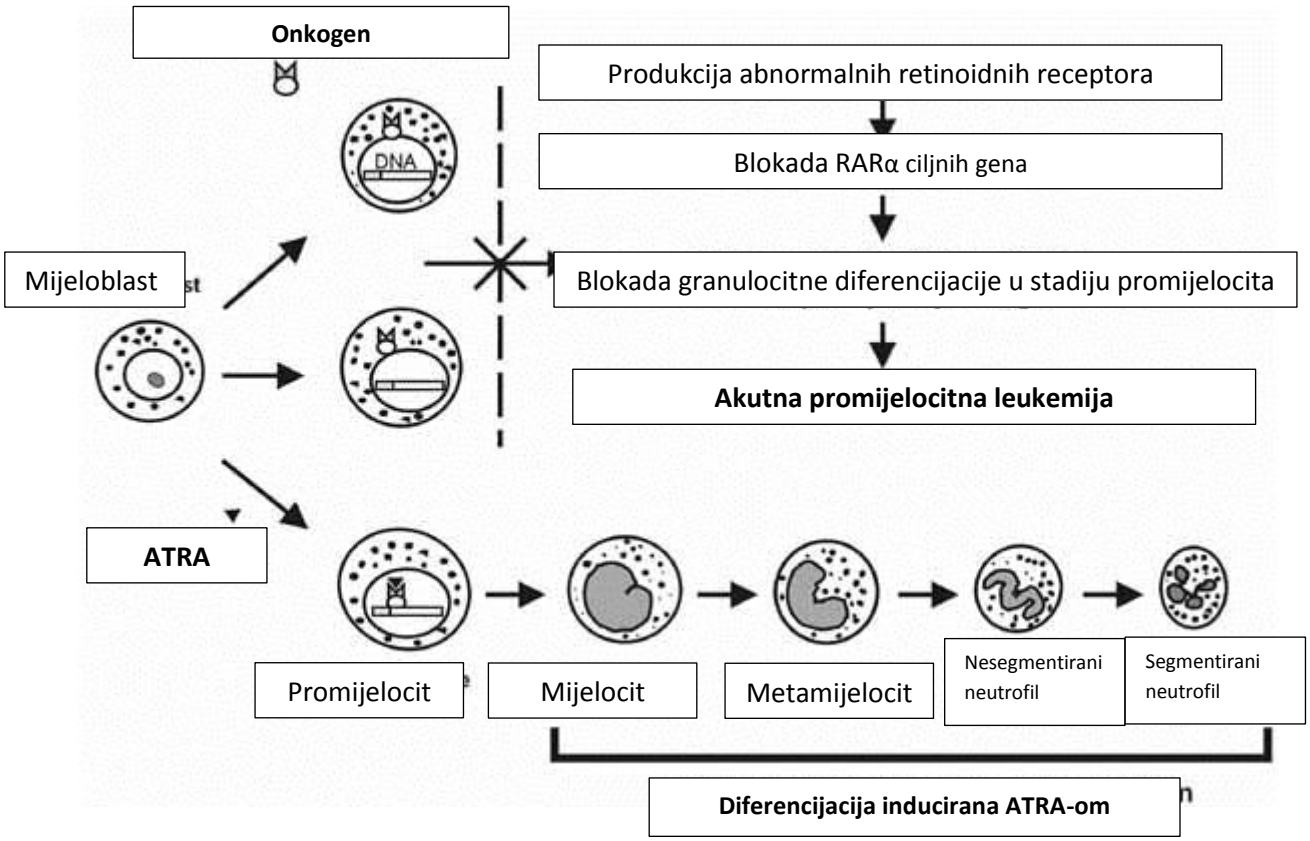
retinoičnom kiselinom (ATRA) ili arsen-trioksidom (44) kao oblik APL koja nosi translokaciju t(15;17). Neke od tih varijanti, kao primjerice APL s onkogenom PLZF/RARα, odnosno translokacijom t(11;17), imaju značajno lošiju prognozu upravo zbog izostanka adekvatnoga odgovora na diferencijacijsku terapiju ATRA-om ili arsen-trioksidom (45-47).

Srednja životna dob u kojoj se pojavljuje APL je 40 godina, za razliku od prosjeka za pojavu AML koji iznosi 69 godina (48). Nešto se češće razvija u ljudi hispanskog podrijetla (49). APL se javlja i u djece, u kojih se češće razvija hiperleukocitoza i mikrogranularni morfološki subtip (50-54). Kao i kod odraslih, djeca s manjim brojem leukocita (<10000/μL) imaju bolju prognozu u odnosu na bolesnike s izrazitom leukocitozom (55). Klinička slika APL često se očituje poremećajem zgrušavanja krvi koja nastaje kao posljedica trombocitopenije i hipofibrinogenemije već u vrijeme postavljanja dijagnoze (56). Zbog tog poremećaja tijekom indukcijske terapije može doći do po život opasnih komplikacija, primjerice krvarenja (27). Prvotna dijagnoza postavlja se na temelju kliničke slike, razmaza periferne krvi te biopsije ili aspirata koštane srži (57). U razmazu periferne krvi znakovit je nalaz leukopenije i promijelocita koji sadrže azurofilne granule. U koštanoj srži također se nalaze abnormalni promijelociti s prominentnim citoplazmatskim granulama (58). Liječenje ATRA-om te citostaticima i suportivnom terapijom potrebno je započeti što prije kako bi se liječila koagulopatija i potaknula diferencijacija (59).

APL je primjer maligne bolesti s visokom stopom izlječenja zahvaljujući molekularnoj terapiji koja izravno djeluje na genetsku abnormalnost koja je obilježje ove bolesti te potiče degradaciju onkoproteina PML/RARα (60, 61) (Slika 4).



Slika 3. **Shematski prikaz djelovanja *all-trans* retinoične kiseline (ATRA) na degradaciju fuzijskog onkoproteina PML/RARα (prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoid receptor* α).** ATRA potiče aktivaciju kaspaze-3 što dovodi do cijepanja onkoproteina PML/RARα. Također, ATRA potiče djelovanje proteasoma SUG-1 (prema engl. *26S proteasome regulatory subunit 1*) zbog čega dolazi do degradacije PML/RARα. Modificirano prema: *Zhu J, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. Oncogene. 2001;20:7257-65.*



Slika 4. Patogeneza akutne promijelocitne leukemije (APL) i odgovor stanica na diferencijacijsku terapiju *all-trans* retinoičnom kiselinom (ATRA). Leukemijske stanice sadrže translokaciju t(15;17) koja dovodi do nastanka fuzijskog onkogena PML/RARα (prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoid acid receptor α*). Time je onemogućena funkcija normalnog receptora RARα (prema engl. *retinoid acid receptor α*) i njegova aktivacija fiziološkima dozama ATRA-e. Dolazi do nakupljanja malignih promijelocita, odnosno blokiranja terminalne diferencijacije u granulocite. Liječenjem visokim dozama ATRA-e (oko 1000 puta veće od fizioloških koncentracija) dolazi do degradacije onkoproteina PML/RARα, uspostavlja se funkcija divljeg RARα i time omogućava diferencijacija u granulocite. Modificirano prema: *Shen PF. Molecular mechanisms of chemoprevention and therapy of cancer by retinoids. Front Biosci. 2004;9:2663-70.*

1.2.4. Liječenje akutne promijelocitne leukemije

Temeljni princip liječenja APL podrazumijeva osjetljivost zloćudnih leukemijskih stanica na diferencijacijsku terapiju ATRA-om i arsen-trioksidom. Već su 1980. godine Breitman i suradnici pokazali da retinoična kiselina (RA), derivat vitamina A, potiče terminalnu diferencijaciju stanica APL *in vitro* (62, 63). Kasnije su Huang i suradnici u kliničkom istraživanju u koje su uključili bolesnike oboljele od APL liječene ATRA-om pokazali da je čak 95,8% bolesnika postiglo potpunu remisiju, bez razvoja hipoplazije koštane srži i povećane sklonosti hiperkoagulobilnosti (64).

Retinoidi su tvari koje su nužne za normalnu diferencijaciju stanica mijeloidne loze. Djeluju putem receptora RAR (prema engl. *retinoid acid receptor*) i RXR (prema engl. *retinoid X receptor*). Receptori RAR i RXR imaju tri subtipa: α, β i γ (65). U fiziološkim koncentracijama retinoida RARα stvara heterodimer s RXR i veže se za RA te na taj način kontrolira izražaj ciljnih gena, primjerice C/EBP (prema engl. *CCAAT enhancer binding protein*) ε i C/EBPα, Asb2 (prema engl. *ankyrin repeat and SOCS box protein 2*), MYC, itd (35, 66). U više od 95% bolesnika oboljelih od APL u zloćudnom klonu prisutna je translokacija t(15;17) koja je uzrok nastanka fuzijskog transkripta PML/RARα (37, 38). Taj transkript djeluje kao dominantno negativna mutacija i koči divlji tip receptora RARα. Onkoprotein PML/RARα veže se za ciljne gene retinoičnih receptora i djeluje kao represor transkripcije. Liječenje ATRA-om uzrokuje degradaciju i promjenu konformacije onkoproteina PML/RARα (64) omogućavajući daljnju diferencijaciju promijelocita te njihovo morfološko i funkcionalno sazrijevanje (63, 67-71). Osim toga, ATRA inducira izražaj gena ovisnih o RA uključujući transkripcijske faktore, gene uključene u modulaciju proteina, apoptozu i proliferaciju (66). Primjerice, regulira izražaj gena

uključenih u sazrijevanje hematopoetskih stanica, a može regulirati i izražaj gena koji sudjeluju u zloćudnoj preobrazbi stanica (72). ATRA regulira izražaj ciklooksigenaze 1 i tako pridonosi terminalnoj diferencijaciji stanica (73). Može kočiti angiogenezu smanjujući produkciju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*) (74). ATRA smanjuje razinu tromboplastina, zbog čega dolazi do smanjenja prokoagulantne aktivnosti (75). Također, potiče neke signalne puteve, primjerice, interferonski signalni put te na taj način smanjuje rast tumorskih stanica karcinoma debelog crijeva (76).

Diferencijacija stanica APL karakterizirana je morfološkim promjenama, tako da stanice zadobivaju karakteristike zrelih granulocita te u većoj mjeri izražavaju diferencijacijske površinske stanične biljege CD11b i CD11c (77-81). Divlji tip RARα djeluje kao unutarstanični receptor za RA. Njegova prisutnost u fuzijskom transkriptu PML/RARα omogućava djelovanje ATRA-e na zloćudne stanice (82). Nakon diferencijacije stanice APL odumiru apoptozom (83). Većina bolesnika nakon liječenja ATRA-om ulazi u stanje potpune remisije, iako liječenje samo ATRA-om ne dovodi do potpunog izlječenja zbog razvoja rezistencije zloćudnih stanica (64, 84). Upravo zbog toga standardni protokoli liječenja uključuju kombinaciju ATRA-e s citostaticima poput antraciklina i citarabina (85-87). ATRA se također koristi i u postindukcijskoj konsolidacijskoj terapiji u kombinaciji sa antraciklinom s ili bez citarabina (52, 88-90).

Arsen-trioksid je tvar koja također može potaknuti diferencijaciju stanica APL. Već 70-tih godina kineska skupina autora uočila je da se intravenskom infuzijom otopine arsen-trioksida postigla potpuna remisija u dvije trećine ispitivanih bolesnika koji su bolovali od APL, a desetogodišnje preživljenje iznosilo je oko 30% (91). Veliki broj istraživanja koja su slijedila pokazao je da se arsenom može postići potpuna remisija u čak 85% do 90% bolesnika (92-94). Klinički potpuna remisija praćena je i molekularnom remisijom, odnosno odsutnošću onkogena

PML/RARα (95) te se drži da je arsen pogodan lijek u fazi indukcijske terapije kao i terapije održavanja (96). Učinak arsen-trioksida ovisan je o dozi, u visokim koncentracijama uzrokuje apoptozu stanica APL, a u nižim potiče diferencijaciju. Ti učinci praćeni su degradacijom onkogena PML/RARα (97), što dovodi do diferencijacije stanica APL te kočenja zloćudne proliferacije i poticanja apoptoze (98). U bolesnika liječenih arsen-trioksidom mogu se javiti nuspojave poput produljenja QT-intervala u EKG-u, APL-diferencijacijski sindrom, odnosno kardiorespiratorni distres sa plućnim infiltratima (99). APL-diferencijacijski sindrom nastaje kao posljedica upalnog odgovora uzrokovanog nagomilavanjem stanica u procesu diferencijacije. To dovodi do otpuštanja citokina, nakupljanja stanica u organima, poglavito plućima i nastanka edema kao posljedice povećane propustljivosti kapilara (100). U nekim studijama praćena je učinkovitost kombiniranog liječenja ATRA-om, arsenom-trioksidom i citostaticima u indukcijskom liječenju, konsolidacijskoj terapiji i terapiji održavanja te je postignuta stopa potpune remisije od 93% i ukupno petogodišnje preživljenje od čak 97% (101). Danas se drži da se bolesnike u kojih postoji kontraindikacija za liječenje antraciklinom može uspješno liječiti kombinacijom ATRA-e i arsen-trioksida. Takva kombinacija mogla bi zamijeniti kemoterapijske protokole koji se baziraju na terapiji antraciklinskim citostaticima (58). Daljnja laboratorijska i klinička istraživanja potrebna su kako bi se pronašao najučinkovitiji model za liječenje oboljelih od APL u različitim fazama bolesti.

1.3. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI

Koštani morfogenetski proteini (BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*) pripadaju nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF-β, prema engl. *transforming growth factor β*), a otkriveni su kao čimbenici koji potiču stvaranje kosti. Do danas je otkriveno preko 20 različitih molekula BMP te je potvrđeno da oni djeluju kao multifunkcionalni čimbenici koji sudjeuju u regulaciji proliferacije, diferencijacije i apoptoze brojnih vrsta stanica, uključujući i hematopoetske stanice (102, 103) (Tablica 3).

Molekule BMP djeluju preko serin/treonin-kinaznih receptora podjeljenih u skupinu I i II. Poznata su tri receptora iz skupine I: BMPRIA (BMP receptor-IA) ili Alk-3 (prema engl. *activin-like kinase 3*), BMPRIB (BMP receptor-IB) ili Alk-6 (prema engl. *activin-like kinase 6*) te ActR-IA ili Alk-2 (prema engl. *activin receptor IA ili activin-like kinase 2*) (104). Skupinu II čine BMPRII (BMP receptor-II) te ActR-IIA (prema engl. *activin receptor IIA*) i Act-IIB (prema engl. *activin receptor IIB*) (105) (Tablica 4).

Molekule BMP vežu se na receptore BMP te se signal prenosi u stanicu preko signalnoga puta u kojem sudjeluju molekule SMAD (prema engl. *small mothers against decapentaplegic*) (106). Otkrivene su tri grupe proteina SMAD: Co-SMAD (prema engl. *common SMAD*) u koju pripada SMAD-4, R-SMAD (prema engl. *receptor regulated SMADs*) kojoj pripadaju SMAD -1, -2, -3, -5 i -8 i I-SMAD (prema engl. *inhibitory SMADs*) kojoj pripadaju SMAD-6 i -7 (107). Djelovanjem molekule BMP dolazi do aktivacije molekula iz skupine R-SMAD. Fosforilirane bjelančevine SMAD-1, -5 i -8 vežu se s molekulom SMAD-4, te se taj molekularni kompleks prenosi u jezgru gdje djeluje na prepisivanje ciljnih gena i sudjeluje u interakcijama s ostalim transkripcijskim čimbenicima (108) poput Runx2 (prema engl. *runt-related transcription factor*

2), Osx (prema engl. *osterix*) u osteoblastima te Dlx5 (prema engl. *distal less homebox 5*) i djeluje na ciljne gene molekula BMP (Slika 5). Osim putem SMAD-signalnog puta, molekule BMP mogu aktivirati i signalne puteve Wnt (prema engl. *wingless type*), MAPK (prema engl. *mitogen-activated protein kinase*), protein kinaze C, Notch (prema engl. *neurogenic locus notch homolog*), kalcij/kalmodulin te JAK/STAT (prema engl. *Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) (109). Ta se aktivacija može odvijati putem molekula SMAD ili neovisno o njima (110-112). Negativna regulacija djelovanja molekula BMP nakon vezanja za receptore moguća je u gotovo svakom koraku signalnoga puta BMP/SMAD (113). Tako se molekule SMAD-6 i -7 mogu vezati za receptor tip I molekula BMP i spriječiti aktivaciju kompleksa SMAD1/5/8 (114, 115). Ove molekule mogu potaknuti djelovanje ligaze Smurf (prema engl. s*mad ubiquitin regulatory factor*) 1 i 2 te uzrokovati degradaciju aktiviranog receptora tip I (116). Pojačani izražaj SMAD-6 u hondrocitima sprječava njihovu diferencijaciju i sazrijevanje (117), a pojačani izražaj SMAD-7 povezan je sa sprječavanjem karcinogeneze i smanjenjem upalnih procesa (116). Smurf 1 može uzrokovati degradaciju Runx2, a njegov pojačani izražaj može inhibirati stvaranje kosti u miša (118). Uz to, neke molekule djeluju kao izvanstanični antagonisti molekula BMP, a to su NOGGIN, *chordin*, *folistatin* i proteini iz obitelji DAN (prema engl. *differential screening selected gene abberative in neuroblastoma*) (113, 119). NOGGIN, *chordin* i DAN-molekule blokiraju djelovanje molekula BMP vezujući se za receptore BMP te tako onemogućavaju vezanje samih agonista (120, 121). Pojačani izražaj NOGGIN-a u osteoblastima može dovesti do nastanka osteoporoze u miša (122), dok je pojačani izražaj *chordina* odgovoran za poremećaj sazrijevanja hondrocita (123). U fiziološkim uvjetima antagonisti molekula BMP imaju važnu ulogu u regulaciji djelovanja molekula BMP, a

poremećaji signalnoga puta BMP/SMAD mogu dovesti do nastanka različitih bolesti uključujući zloćudne, koštane i krvnožilne bolesti.

Tablica 3. Djelovanje koštanih morfogenetskih proteina na različita tkiva i organe*

Koštani morfogenetski protein (BMP)	Djelovanje
BMP-1	Hondrogeneza, održavanje izvanstaničnog matriksa
BMP-2	Osteoindukcija, diferencijacija osteoblasta, apoptoza
BMP-3 (osteogenin)	Inhibira osteogenezu, najzastupljeniji BMP u kosti
BMP-4	Osteoindukcija, razvoj pluća i oka
BMP-5	Hondrogeneza
BMP-6	Diferencijacija osteoblasta, hondrogeneza
BMP-7 (OP-1)	Osteoindukcija, razvoj bubrega i oka
BMP-8 (OP-1)	Osteoindukcija
BMP-9	Razvoj živčanog sustava, jetrenog retikuloendotelnog sustava
BMP-10	Razvoj srca
BMP-11 (GDF-8)	Razvoj živčanog tkiva
BMP-12 (GDF-7)	Nastanak tetiva
BMP-13 (GDF-6)	Nastanak tetiva i ligamenata
BMP-14 (GDF-5)	Hondrogeneza, potiče cijeljenje tetiva i stvaranje kosti
BMP-15	Razvoj oocita i folikula

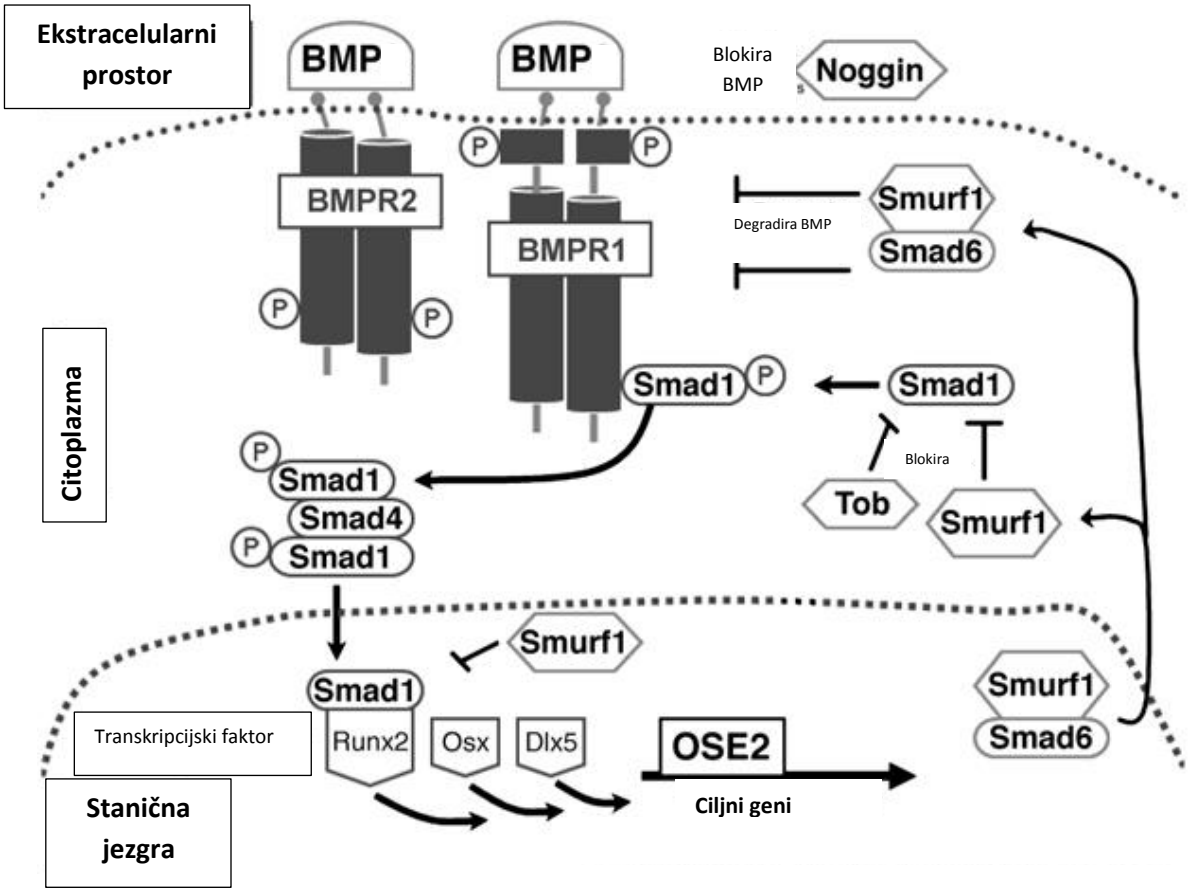
BMP (koštani morfogenetski protein, prema engl. *bone morphogenetic protein*), GDF (čimbenik rasta/diferencijacije, prema engl. *growth/differentiation factor*), TGF-β (transformirajući čimbenik rasta β, prema engl. *transforming growth factor β*), FSH (folikul stimulirajući hormon)

*Modificirano prema: *Rao SM, Ugale GM, Warad SB. Bone morphogenetic proteins: periodontal regeneration. N Am J Med Sci. 2013;5:161-8.*

Tablica 4. Stanični receptori za koštane morfogenetske proteine.

BMP receptor	Sinonimi	BMP ligand
BMPRIA (BMP receptor-IA)	Alk-3 (prema engl. *activin-like kinase 3*)	BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-12, BMP-13, BMP-14
BMPRIB (BMP receptor-IB)	Alk-6 (prema engl. *activin-like kinase 6*)	BMP-2, BMP-4, BMP-12, BMP-13, BMP-14
ActR-IA (prema engl. *activin receptor IA*)	Alk-2 (prema engl. *activin-like kinase 2*)	BMP-5, BMP-6, BMP-7
BMPRII (BMP receptor-II)		BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-9, BMP-10, BMP-12, BMP-13, BMP-14
ActR-IIA (prema engl. *activin receptor IIA*)		BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-9, BMP-10, BMP-12, BMP-13, BMP-14
Act-IIB (prema engl. *activin receptor IIB*)		BMP-2, BMP-4 BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-9, BMP-10, BMP-12, BMP-13, BMP-14

BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, koštani morfogenetski protein



Slika 5. **Signalni put koštanih morfogenetskih proteina** (BMP, prema engl. *bone morphogenetic proteins*). Molekule BMP vežu se za receptore BMP (BMPR) 1 i 2. Taj kompleks fosforilira molekule SMAD (prema engl. *small mothers against decapentaplegic*) 1/5/8 koje se potom vežu za SMAD-4. Takav se spoj prenosi u jezgru gdje potiče transkripcijske čimbenike poput Runx2 (prema engl. *runt-related transcription factor 2*), Osx (prema engl. *osterix*) u osteoblastima te Dlx 5 (prema engl. *distal less homebox 5*) i djeluje na ciljne gene molekula BMP koji sudjeluju u brojnim staničnim procesima. Antagonisti molekula BMP poput NOGGIN-a vežu se za molekule BMP i blokiraju njihovo djelovanje. SMAD-6 veže se za BMPR1 i sprječava fosforilaciju SMAD 1/5/8 kompleksa. Antiproliferativni protein Tob (prema engl. t*ransducer of ErbB2*) i Smurf1 (prema engl. s*mad ubiquitin regulatory factor 1*) vežu se za SMAD-1 i -5 te blokiraju signal BMP. OSE2 (prema engl. *osteocalcin specific element 2*). Modificirano prema: *Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. 2004;22:233-41.*

1.3.1. Djelovanje koštanih morfogenetskih proteina

Djelovanje molekula BMP na mineralizirana tkiva

Molekule BMP imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze različitih procesa u organizmu. Prije svega poznate su po svojoj ulozi u stvaranju kosti i hrskavice (108). Dokazana je njihova sposobnost poticanja nastanka hrskavice i endohondralne kosti kada se implantiraju subkutano ili intramuskularno u pokusne životinje (124). Mogu potaknuti sintezu hrskavičnog matriksa, proteoglikana, kolagena tipa II i hijalurona (125) te susljedno inducirati osteoblastogenezu i stvaranje kosti (126). Molekule BMP važne su za diferencijaciju hondrocita (127), mogu preusmjeriti diferencijaciju mioblasta u osteoblaste (128), a imaju i važnu ulogu u determinaciji i sazrijevanju osteoblasta (129). Otkriveno je i da rekombinantni humani BMP1-3 poboljšava cijeljenje kostiju, a da se njegovom inaktivacijom cijeljenje produžava (130).

Molekule BMP koriste se i u kliničkoj praksi (131). Pokazano je da BMP-2 poboljšava ishod liječenja i kvalitetu života bolesnika kod spinalnih fuzija u usporedbi sa standardnim metodama liječenja (132). Također, BMP-7 poboljšava cijeljenje dugih kostiju kao i ishod liječenja spinalnih fuzija (133). Molekula BMP-2 pokazala se učinkovitom u liječenje kraniofacijalnih defekata u eksperimentalnim modelima (134). Daljnja istraživanja su potrebna kako bi klinička primjena molekula BMP, poglavito BMP-2 i -7 bila učinkovitija.

Djelovanje molekula BMP na ostala tkiva i organe

Posebice se istražuje uloga molekula BMP u embrionalnom razvoju. Tijekom ranog embrionalnog razvoja molekule BMP uključene su u procese determinacije, morfogeneze, proliferacije, i diferencijacije (135). Međudjelovanje molekula BMP, poglavito BMP-2, te antagonista BMP-a NOGGIN-a i *chordin-a* ključni su za razvoj mezoderma (136). Izražaj BMP-3 je dokazan u embrionalnim hondrocitima, osteoblastima, periostu, epitelnim stanicama budućega korteksa nadbubrežne žlijezde i zavijenim kanalićima bubrega (137). Poremećaj izražaja molekule BMP-7 u miša dovodi do razvoja disgeničnih bubrega i hidrouretera te uremije (138). U štakora sa kroničnom bubrežnom bolesti dodavanjem BMP1-3 došlo je do pojačanja fibroze bubrega te je smanjeno preživljenje, dok se inhibicijom cirkulirajućeg BMP1-3 smanjila bubrežna fibroza (139). Molekula BMP-6 odgovorna je za povećanje izražaja hepcidina, hormona uključenog u regulaciju razine željeza te na taj način smanjuje razinu željeza u serumu miša (140). U eksperimentalnim uvjetima molekula BMP-7 smanjila je proliferaciju gliomskih stanica, zaustavljajući napredovanje staničnog ciklusa u fazi G1 bez poticanja apoptoze (141).

Djelovanje molekula BMP na hematopoetski sustav

Stromalne stanice koštane srži i hematopoetske matične stanice stvaraju molekule BMP (142). Molekule BMP djeluju i kao regulatori hematopoetske diferencijacije i funkcije zrelih krvnih stanica (143, 144). Signal BMP važan je za razvoj ventralnog mezoderma iz kojeg potječu primitivne hematopoetske matične stanice (145). Ljudske stromalne stanice koštane srži sintetiziraju molekule BMP te na taj način djeluju na hematopoetske matične stanice preko specifičnih BMP-receptora (103). Hematopoetske stanice tijekom diferencijacije izražavaju gene za molekule BMP, vjerojatno kao dio autokrinih/parakrinih mehanizama regulacije

diferencijacije (146). Neke molekule BMP pokazuju specifičnost za pojedine hematopoetske loze, primjerice BMP-4 izražen je u stanicama T-limfoidnih linija, a BMP-7 u normalnim limfocitima i B-limfoidnoj liniji *Ramos* (147). Molekule BMP mogu izazvati apoptozu mijelomskih staničnih linija i primarnih mijelomskih stanica (148-150). BMP-4 potiče razvoj hematopoetskog tkiva u *Xenopusu* (151) i diferencijaciju mišje embrionalne stanične linije prema hematopoetskim lozama (152). Naša istraživačka skupina pokazala je da su molekule BMP-2, BMP-4, BMP-7 i njihovi receptori izraženi u uzorcima koštane srži bolesnika koji boluju od APL te da je terapijski odgovor na djelovanje ATRA-e povezan sa smanjenjem izražaja molekula BMP (153). Poznato je i da je gen koji kodira molekulu SMAD-5, i koji djeluje kao tumor-supresorski gen, mutiran u stanicama stanične linije HL60 (154).

Molekule BMP, osim već poznate uloge u razvoju kosti i hrskavice, imaju važnu ulogu u procesima diferencijacije i tumorigeneze. Kako su molekularne interakcije BMP-a vrlo kompleksne u uvjetima *in vivo*, potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdila njihova učinkovitost u kliničkim uvjetima.

1.4. STANIČNE LINIJE KAO MODELI AKUTNE MIJELOIDNE LEUKEMIJE

Istraživanja molekularnih i genetskih poremećaja u leukemijskom klonu znatno pridonose razjašnjenju patogenetskih mehanizama akutnih mijeloidnih leukemija. Do pronalaska staničnih linija kao pokusnih modela, istraživanja na području humanih mijeloidnih leukemija bila su uvelike otežana. Životinjski modeli za ova istraživanja nisu pogodni jer se biologija životinjskih leukemija uvelike razlikuje od ljudskih. Osim toga, istraživanja na ljudskim leukemijskim stanicama limitirana su količinom prikladnog tkiva za analizu i kratkoćom preživljenja tih stanica. Zato se već sredinom prošlog stoljeća javila potreba za uspostavom trajnih ljudskih leukemijskim staničnih linija kao adekvatnog modela za istraživanje različitih tipova akutne mijeloidne lekemije (155). Iako su se u početku javljale sumnje da stanične linije nisu dobri modeli za istraživanje, molekularnim analizama dokazano je da su mijeloidne stanične linije stabilne i da zadržavaju citogenetske aberacije karakteristične za ljudske leukemije (156, 157). Također, te su linije monoklonalnog porijekla te zadržavaju stanična obilježja ishodišne linije kao i sposobnost proliferacije (155). Prednost je i što se stanice linija nalaze na istom stupnju diferencijacije te su komercijalno dostupne i mogu se dugotrajno pohranjivati u tekućem dušiku (158). Ipak, unatoč brojnim prednostima postoje i neka ograničenja upotrebe staničnih linija. Prije svega, takve su stanice izdvojene iz okoliša u kojem se uobičajeno nalaze u ljudskom organizmu te nisu pod utjecajem čimbenika koji se proizvode *in vivo*. Isto tako, različiti postupci koji se istražuju dodaju se izravno u stanični okoliš malignoga klona, za razliku od sistemske primjene u organizmu. Iz svega proizlazi da se rezultati istraživanja dobiveni na staničnim linijama ne mogu izravno prenijeti na ljudski organizam. Ipak, unatoč ograničenjima, trajne stanične linije su vrlo korisne za istraživanje zloćudnih hematoloških bolesti, poglavito bolesti koje se rijetko javljaju u populaciji.

U ovom istraživanju, da bi dokazali učinak molekula BMP na diferencijaciju stanica APL induciranu ATRA-om, osim ljudskih uzoraka, koristili smo dvije stanične linije mijeloidne leukemije: NB4 i HL60.

Stanična linija NB4, opisana je još 1991. godine. Lanotte i sur. izolirali su staničnu liniju s translokacijom t(15;17) kao značajkom APL, iz koštane srži bolesnika u fazi relapsa APL (159). Stanice te linije odgovaraju diferencijacijom na tretiranje RA i arsen-trioksidom.

Staničnu liniju HL60 opisivali su različiti autori 70-tih godina prošlog stoljeća (160-162). Iako se prvotno smatralo da je dobivena iz leukocita periferne krvi bolesnice oboljele od APL (163), kasnijom revizijom izvornih uzoraka utvrđeno je da se ipak radi o akutnoj mijeloblastičnoj leukemiji (164). Linija HL60 odgovara podtipu M2 akutnih mijeloidnih leukemija prema FAB-klasifikaciji te ne nosi translokaciju t(15;17). Unatoč tomu, odgovara na obradu ATRA-om (165) i njene se stanice diferenciraju u neutrofile.

Poznate su i druge trajne stanične linije koje se rabe kao model APL. Primjerice, linija UF-1, koja je otporna na djelovanje retinoične kiseline (166), HT93 koja se djelovanjem ATRA-e diferencira u neutrofile i eozinofile (167), AP-1060 koja se pokazala razmjerno rezistentna na djelovanje ATRA-e i arsen-trioksida (168) te PL-21, koja ne nosi translokaciju t(15;17), a stanice imaju obilježja monocita (169).

U ovom istraživanju, uporabom različitih leukemijskih linija, testirali smo učinak istraživanih molekula na biološki raziličite vrste stanica, a sličnu biološku varijabilnost nalazimo i u ljudskim uzorcima. Stanične linije omogućavaju nam u uvjetima *in vitro* istraživanje mehanizma djelovanja različitih molekula koje potencijalno imaju učinak i u ljudskom organizmu.

2. HIPOTEZE

- Molekule BMP djeluju tako da sprječavaju diferencijaciju stanica APL (mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60) potaknutu ATRA-om iz malignih promijelocita u granulocite.
- Učinak molekula BMP na sprječavanje diferencijacije staničnih linija NB4 i HL60 potaknutih ATRA-om temelji se na promjeni izražaja unutarstaničnih molekula važnih za diferencijaciju i proliferaciju tih stanica.
- Promjene u izražaju tih regulacijskih molekula prisutne su i u uzorcima koštane srži i periferne krvi bolesnika koji boluju od APL u vrijeme postavljanja dijagnoze i nakon liječenja ATRA-om.

3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi mehanizam kočenja diferencijacije stanica APL, potaknute ATRA-om, djelovanjem molekula BMP, uporabom mijeloidnih leukemijskih staničnih linija NB4 i HL60 te analizom uzoraka koštane srži i periferne krvi bolesnika oboljelih od APL.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Istražiti učinak ATRA-e na diferencijaciju, apoptozu i proliferaciju mijeloidnih leukemijskih staničnih linija NB4 i HL60.
2. Istražiti učinak molekula BMP-2, BMP-4 i BMP-6 na diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu mijeloidnih leukemijskih staničnih linija NB4 i HL60 obrađenih ATRA-om, na temelju fenotipskih, morfoloških i molekularnih biljega.
3. Istražiti molekularni mehanizam učinka molekula BMP na sprječavanje diferencijacije mijeloidnih leukemijskih staničnih linija NB4 i HL60, obrađenih ATRA-om, praćenjem izražaja unutarstaničnih molekula na koje djeluje BMP-signalni put.
4. Istražiti promjene u izražaju molekula BMP, BMP-receptora, BMP-antagonista, molekula na koje djeluje BMP-signalni put i diferencijacijskih biljega stanica APL u uzorcima bolesnika koji boluju od APL u odnosu na primjenu ATRA-e i izražaj fuzijskog onkogena PML/RARα.

4. MATERIJALI I METODE

Pokusi u okviru ove doktorske disertacije napravljeni su u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Imunološkom laboratoriju Zavoda za fiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.1. Stanične linije

Stanične linije humane mijeloidne leukemije NB4 i HL60 kupljene su od *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-DSMZ* (Braunschweig, Germany) i održavane na temperaturi od 37°C uz 5% CO_2 u mediju *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 obogaćenim s 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM glutamaksa, 100 U/mL penicilina i 100 μg/mL streptomicina (Gibco/Invitrogen, Grand Island, SAD). Stanična linija akutne promijelocitne leukemije NB4 nosi specifičnu translokaciju t(15;17), dok je HL60 linija mijeloblastične leukemije te nema specifičnu translokaciju t(15;17). Unatoč toj razlici, obje stanične linije se djelovanjem ATRA-e diferenciraju u granulocite.

4.2. Izazivanje, praćenje i procjena diferencijacije staničnih linija NB4 i HL60 potaknute ATRA-om

U svim pokusima 3×10^6 stanica posađeno je u 10 ml medija RPMI u posudama površine 25 cm^2. Kako bi potaknuli diferencijaciju stanice smo obradili ATRA-om u različitim dozama (u rasponu doza od 0,25 μM do 2 μM), kako je navedeno u pojedinim pokusima, tijekom 4 dana. Diferencijaciju stanica analizirali smo svaka 24 sata do ukupno 96 sati. Analizirali smo izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD11c, apoptozu stanica bojanjem Annexin V/PI te promjene u staničnom ciklusu bojenjem Vindelovom bojom protočnom citometrijom. Morfološke promjene dokazane su pomoću bojenja po May-Grunwald Giemsi. Promjene u izražaju RARα, onkogena PML/RARα, BMP-receptora i gena BMP-signalnog puta analizirali smo pomoću qPCR.

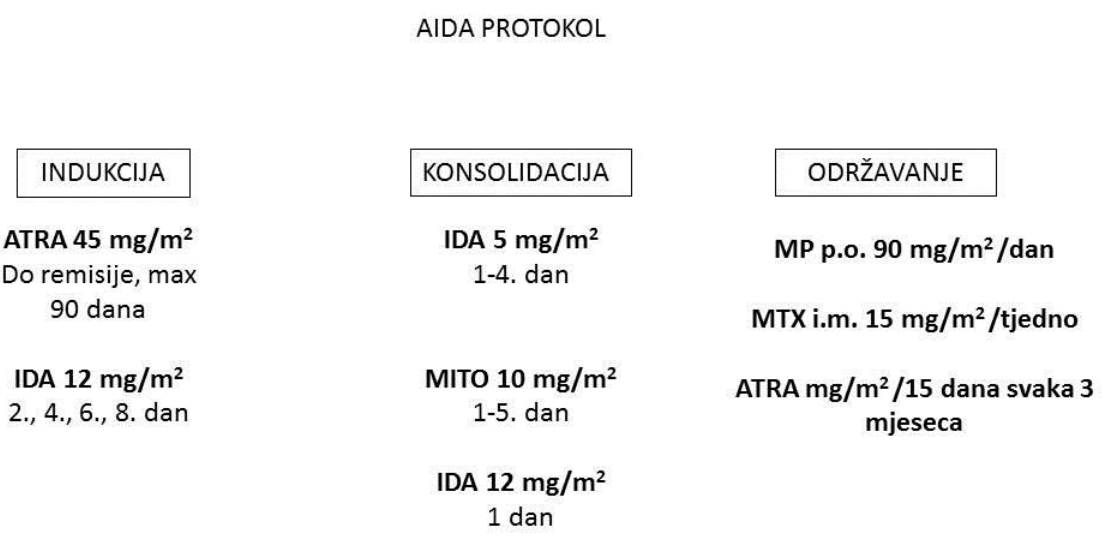
4.3. Obrada stanica s koštanim morfogenetskim proteinima

U pojedinim pokusima stanice su obrađene rekombinantnim humanim (rh) BMP-2, BMP-4 ili BMP-6 (R&D Sytems, Abingdon, UK) te BMP-antagonistom NOGGIN (NOG) (PeproTech, London, UK). Nakon testiranja različitih doza i optimiziranja uvjeta obrade u preliminarnim pokusima (170), za istraživanje smo koristili molekule BMP u dozi od 25 ng/ml i NOGGIN u dozi od 100 ng/ml.

4.4. Bolesnici

Nakon što smo dobili odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakuteta Sveučilišta u Zagrebu i informirani pristanak od bolesnika, uzorci koštane srži i periferne krvi pet bolesnika oboljelih od APL prikupljeni u okviru kliničke obrade, dodatno su analizirani za potrebe ovoga istraživanja. Uzorci koštane srži uzeti su sterilnom punkcijom ilijačne kosti. Uzorci periferne krvi uzeti su standardnom venepunkcijom nakon čega su mononuklearne stanice izdvojene separacijom na gradijentu Ficoll-a (Histopaque, Sigma, St. Louis, SAD; gustoća 1.077 g/ml). Ukupno smo analizirali 8 uzoraka za bolesnika #1 u različitim fazama bolesti, 6 uzoraka za bolesnika #2, 3 uzorka za bolesnika #3, 7 uzoraka za bolesnika #4 i 4 uzorka za bolesnika #5. Dijagnoza je postavljena na temelju morfoloških, citokemijskih i citogenetskih karakteristika te imunofenotipiziranjem na temelju FAB-klasifikacije za AML-M3 (171). Citogenetskom analizom u svih je bolesnika dokazana prisutnost translokacije t(15;17). Izražaj onkogena PML/RARα dokazan je kvantitativno pomoću qPCR analize.

U okviru terapijskog postupka bolesnici su liječeni prema modificiranom protokolu AIDA (87) (Slika 6). U okviru indukcijske terapije bolesnici su primali ATRA-u peroralno u dozi od 45 mg/m^2 dnevno, podijeljeno u dvije doze, te četiri doze 12 mg/m^2 idarubicina (svaki drugi dan, počevši od drugog dana liječenja) u bolusu intravenski (15-30 minuta). Bolesnici su liječeni tijekom 30 dana, odnosno do postizanja kompletne hematološke remisije. Potom su mjesec dana primali idarubicin 5 mg/m^2/dan u četiri doze, drugi mjesec mitoksantron 10 mg/m^2/dan u pet doza i treći mjesec idarubicin 12mg/m^2/dan u jednoj dozi. Uslijedila je terapija održavanja koja je uključivala merkaptopurin peroralno 90 mg/m^2/dan, metotreksata intramuskularno 15 mg/m^2/tjedno i ATRA-u 45 mg/m^2/dnevno tijekom 15 dana svaka 3 mjeseca.



Slika 6. Liječenje prema modificiranom AIDA-protokolu. Liječenje bolesnika oboljelih od APL provodi se u tri faze, a prema navedenom protokolu temelji se na davanju ATRA-e uz citostatsku terapiju: indukcija do postizanja kompletne remisije ili maksimalno 90 dana, tri ciklusa konsolidacijske terapije i održavanje kroz dvije godine. Prikazani su lijekovi i doze koji se koriste u pojedinoj fazi liječenja. ATRA, *all-trans* retinoic acid; IDA, idarubicin; MITO, mitoksantron; MP, merkaptopurin; MTX, metotreksat; p.o., peroralno; i.m. intramuskularno. Modificirano prema: *Avvisati G et al. AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance. Blood. 2011;117:4716-25.*

4.5. Morfološka analiza stanica – May-Grunwald Giemsa bojenje

Za morfološku potvrdu diferencijacije stanice su pripremljene na predmetnim stakalcima i bojane May-Grunwald bojom tijekom 3 minute. Potom su isprane destiliranom vodom i dalje bojane Giemsa bojom (razrjeđenom vodom u omjeru 1:10) tijekom 20 minuta. Nakon toga stanice su analizirane pod imerzijom na svjetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss Axiovision 4.1) uz povećanje 1000×. Stanice koje su pokazivale obilježja granulocita (svijetle citoplazme i multilobularne segmentirane jezgre) su smatrane diferenciranima, dok su stanice sa okruglim jezgrama i bazofilnom citoplazmom smatrane promijelocitima.

4.6. Protočno-citometrijska analiza

Fenotipska diferencijacija

Nakon obrade analizirali smo diferencijaciju staničnih linija NB4 i HL60 na temelju izražaja membranskih biljega granulocita CD11b i CD11c protočno-citometrijski. Stanice (10^6) smo oprali u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate-buffered saline*). Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela konjugirana s fluorescentnim bojama: fluorescein-izotiocijanatom (FITC, prema engl. *fluorescein-isothiocyanate*) anti-CD11b (Caltag Laboratories) i fikoeritrinom (PE, prema engl. *phycoerithrin*) anti-CD11c (BD Pharmingen). Svaki uzorak inkubiran je tijekom 30 minuta na 4°C u mraku. Nakon toga stanice su oprane u PBS-u obogaćenom s 2% FCS, a potom resuspendirane u 300 µl PBS-a. Stanice su potom analizirane na protočnom citometru (FACS Calibur, BD Pharmingen). Analizirano je

20000 stanica po uzorku pomoću programa CellQuest (BD Biosciences, San Jose, SAD) i rezultati su prikazani histogramima odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Za postavljanje ograda i određivanje udjela pozitivnih stanica korišteni su neoznačeni uzorci i uzorci označeni kontrolnim neimunim protutijelima istog izotipa.

Apoptoza stanica

Apoptozu stanica linija NB4 i HL60 analizirali smo pomoću bojenja koje je uključivalo FITC-konjugirani Annexin V i propidij jodid (PI, prema engl. *propidium iodide*). Tijekom apoptoze dolazi do promjena u sastavu stanične membrane, odnosno do prebacivanja fosfolipida s unutarnje na vanjsku stranu membrane. Annexin V veže se na negativno nabijeni fosfatidilserin, koji se tijekom apoptoze stanica nalazi na vanjskoj strani membrane. PI se selektivno veže na nukleinske kiseline unutar stanice nakon gubitka integriteta stanične membrane. Istodobnim bojanjem stanica FITC-Annexin V i PI moguće je razlikovati intaktne stanice ($FITC^-$, PI^-), apoptotične ($FITC^+$, PI^-) i nekrotične stanice ($FITC^+$, PI^+) (172). Prema protokolu, $0{,}2\times10^6$ stanica oprali smo u PBS-u i resuspendirali u 100 µl Annexin V-veznog pufera (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$). Zatim smo dodali FITC-Annexin V (5 µl) i PI (0,25 µg) (BD Biosciences) u svaki uzorak te stanice inkubirali u mraku na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon toga smo u uzorke dodali 300 µl Annexin V-veznog pufera i analizirali na protočnom citometru 20000 stanica po uzorku pomoću programa CellQuest. Rezultati su prikazani točkastim grafikonima odnosa intenziteta fluorescencije FITC i PI. Za postavljanje ograda i određivanje udjela pozitivnih stanica korišteni su neoznačeni uzorci i uzorci označeni pojedinačnim fluorescencijama (FITC i PI).

Stanični ciklus

Promjene u staničnom ciklusu analizirali smo bojenjem stanica Vindelovom bojom (0,01 M Tris-baze, 10 mM NaCl, 700 U/L RNAze, $7{,}5\times10^{-5}$ M PI, 0,01% Nonidet P-40). Vindelova boja sadrži PI, fluorescentnu boju koja se veže za nukleinske kiseline. Kako se PI veže i za RNA, Vindelova boja u svom sastavu ima i RNAzu, enzim koji služi za uklanjanje RNA (173). Stanice (10^6) oprali smo dva puta u PBS-u, na talog stanica smo dodali 1 mL Vindelove boje i inkubirali u mraku na 4°C tijekom 45 minuta i potom analizirali na protočnom citometru pomoću programa CellQuest. Faze staničnog ciklusa (G_0/G_1, S, G_2/M) prikazane su na histogramima odnosa fluorescencije PI i broja stanica.

4.7. Analiza genskog izražaja

Izražaj gena analiziran je u stanicama NB4 i HL60 te u uzorcima koštane srži i periferne krvi bolesnika koji boluju od APL. Iz uzoraka je najprije izolirana RNA (TriPure; Roche Mannheim, Germany) prema uputama proizvođača. Nakon dodavanja otopine za izolaciju, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, a potom centrifugirani brzinom od 12000 g tijekom 30 minuta na +4ºC. Potom je u uzorke dodano 0,2 mL kloroforma, uzorci su inkubirani 2 minute na +4ºC i centrifugirani pri 10000 g tijekom 15 minuta na +4ºC. Gornja, vodena faza je prenešena u novu epruvetu, na nju je dodano 0,5 mL izopropanola i inkubirana je tijekom 60 minuta na –20ºC. Ponovnim centrifugiranjem pri 12000 g tijekom 15 minuta na +4ºC je spušten dobiveni precipitat na dno epruvete, opran je 75%-tnim etanolom i centrifugiran brzinom od 7500 rpm tijekom 5 minuta na +4ºC. Talog je otopljen u destiliranoj vodi, te izmjerena količina i čistoća RNA pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (NanoDrop ND-1000

Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc.,Wilmington, DE, SAD). Mjerene su apsorbancije (A) pri 260 nm i 280 nm te određivani njihovi omjeri, koji su iznosili $A_{260/280}$>1,8.

Izolirana RNA u količini od 1 μg po uzorku prepisana je u cDNA postupkom reverzne transkripcije upotrebom seta kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, u svaki uzorak RNA (u ukupnom volumenu 9 μl) dodano je 10 μl 2X RT pufera i 1μl 20X mješavine enzima reverzne-transkriptaze. Uslijedila je inkubacija na 37°C tijekom 60 minuta. Reakcija je zaustavljena grijanjem tijekom 5 minuta na 95°C.

Dobivena cDNA kvantitativno je umnožena postupkom qPCR pomoću uređaja ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Izražaj gena za fuzijski onkogen PML/RARα, ukupni receptor RARα, BMP-molekule (BMP-2, BMP-4, BMP-6), BMP-receptore (ActRIA, BMPRIA, BMPRIB, BMPRII, ActRIIA, ActRIIB), ciljne gene (ID1, ID2, cKit), SMAD-molekule (SMAD-5, SMAD-6), BMP-antagoniste NOGGIN i BAMBI, te diferencijacijske i proliferacijske gene Asb2, PU.1, UBE2D3, C/EBPε, C/EBPα, Dlx4, Bcl-2 određen je pomoću komercijalnog seta kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene-expression Master mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača (Tablica 5). Esej se sastoji od para specifičnih začetnika i probe koja na 5'-kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM, a na 3'-kraju hvatač fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). Proba se veže na cDNA između oba začetnika, a produljenjem začetnika DNA-polimeraza reže probu i tako dovodi do odvajanja fluorescentne boje od NFQ te povećanja intenziteta fluorescencije. Svaka reakcija se odvija u triplikatu, u reakcijskom volumenu od 25 μL. Smjesa sadrži: 0,25 μL cDNA; 0,25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied

Biosystems); po 200 nM začetnika 5' i začetnika 3'; 250 nM TaqMan probe i 0,625 U DNA polimeraze (AmpliTaq Gold DNA polymerase). Reakcija se postavlja u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems). Uzorci se najprije inkubiraju tijekom 2 minute na +50°C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom 10 minuta na +95°C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza. Potom slijedi 40 ciklusa tijekom kojih se uzorci inkubiraju na: +95°C tijekom 15 s i 60°C tijekom 60 s.

Očitanja intenziteta fluorescencije prikazana su grafički, kao odnosi broja ciklusa i logaritma intenziteta fluorescencije (ΔRn; razlika fluorescencije reakcije i "temeljne" fluorescencije). Na sredini linearnog dijela krivulje umnožavanja postavljen je arbitrarni prag i prema njemu određen kritični broj ciklusa (Ct) kao onaj ciklus na kojem razina fluorescencije prelazi arbitrarni prag. Za svaki uzorak izračunata je relativna količina cDNA uporabom standardne krivulje. Standardna krivulja oblikovana je pomoću pet serijskih razrjeđenja uzorka za kalibraciju (cDNA iz obrađenih staničnih linija i uzoraka koštane srži). Standardna krivulja prikazana je grafikonom na kojem su logaritmi količine cDNA prikazani na apscisi, a vrijednosti Ct na ordinati. Relativna količina mRNA u uzorku je tada izražena u arbitrarnim jedinicama (relativna količina) u odnosu na količinu mRNA za GAPDH, kao na "endogenu" kontrolu.

Tablica 5. Eseji korišteni za kvantitativnu analizu PCR

Geni*	Genski simboli	Oznaka eseja (Assay ID)
PML/RARα	**PML-RARA fusion**	Hs03024794_ft
RARα	**RARA**	Hs00940446_m1
BMP-2	**BMP2**	Hs00154152_m1
BMP-4	**BMP4**	Hs00370078_m1
BMP-6	**BMP6**	Hs00233470_m1
ActRIA	**ACVR1**	Hs00153836_m1
BMPRIA	**BMPR1A**	Hs01034910_g1
BMPRIB	**BMPR1B**	Hs00176144_m1
BMPRII	**BMPR2**	Hs00281368_m1
ActRIIA	**ACVR2A**	Hs00155658_m1
ActRIIB	**ACVR2B**	Hs00609603_m1
ID1	**ID1**	Hs03676575_m1
ID2	**ID2**	Hs00747379_m1
cKit	**KIT**	Hs00174029_m1
SMAD5	**SMAD5**	Hs01557453_m1
SMAD6	**SMAD6**	Hs00178579_m1
NOGGIN	**NOG**	Hs00178579_m1
BAMBI	**BAMBI**	Hs00180818_m1
Asb2	**ASB2**	Hs00387867_m1
PU.1	**SPI1**	Hs00281368_m1
UBE2D3	**UBE2D3**	Hs00701790_m1
C/EBPε	**CEBPE**	Hs00357657_m1
C/EBPα	**CEBPA**	Hs00269972_s1
Dlx4	**DLX4**	Hs00231080_m1
Bcl-2	**BCL2**	Hs00153350_m1
GAPDH	**GAPDH**	Hs99999905_ml

* Eseji su komercijalno dostupni i korišteni prema uputama proizvođača (Applied Biosystems)

4.8. Statistička analiza rezultata

Svi pokusi na staničnim linijama ponovljeni su barem četiri puta. Uzorci bolesnika analizirani su pojedinačno za svakog bolesnika. Analize izražaja gena rađene su u triplikatu, a rezultati prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina (kontrolne i obrađene ATRA-om s ili bez dodanog BMP-a, odnosno NOGGIN-a) uspoređene su analizom varijance uz Student–Newman–Keuls *posthoc* test. Izražaj gena u primarnim uzorcima koreliran je s izražajem fuzijskog onkogena PML/RARα i ukupnog RARα pomoću testa korelacije i Spearmanovog koeficijenta korelacije rho (ρ) uz interval podudarnosti (CI, prema engl. *confidence interval*) 95%. Za razinu statističke značajnosti (vrijednost α) uzeli smo 0,05. Za statističku analizu koristili smo računalni program MedCalc (Mariakerke, Belgija).

5. REZULTATI

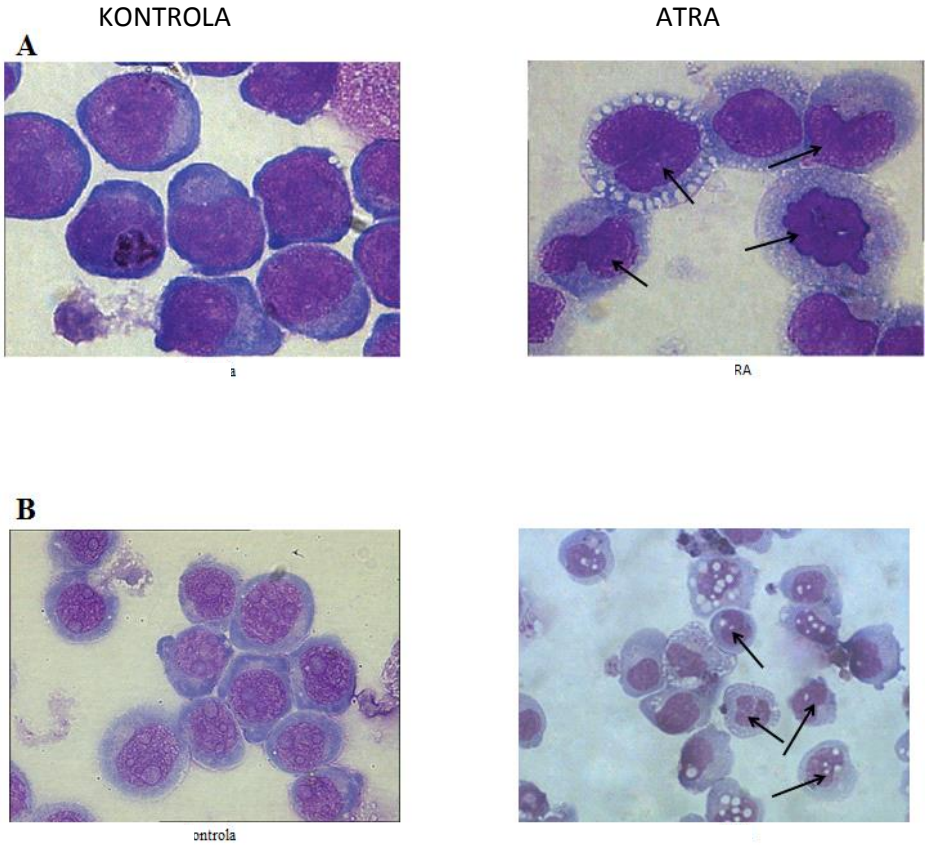
Rezultati ovog istraživanja sastoje se od dva dijela. Najprije smo proučavali mehanizme djelovanja ATRA-e i molekula BMP u uvjetima *in vitro* na mijeloidnim leukemijskim linijama NB4 i HL60, a potom smo dobivene rezultate testirali i u primarnim uzorcima bolesnika oboljelih od APL.

5.1. ATRA potiče diferencijaciju mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60

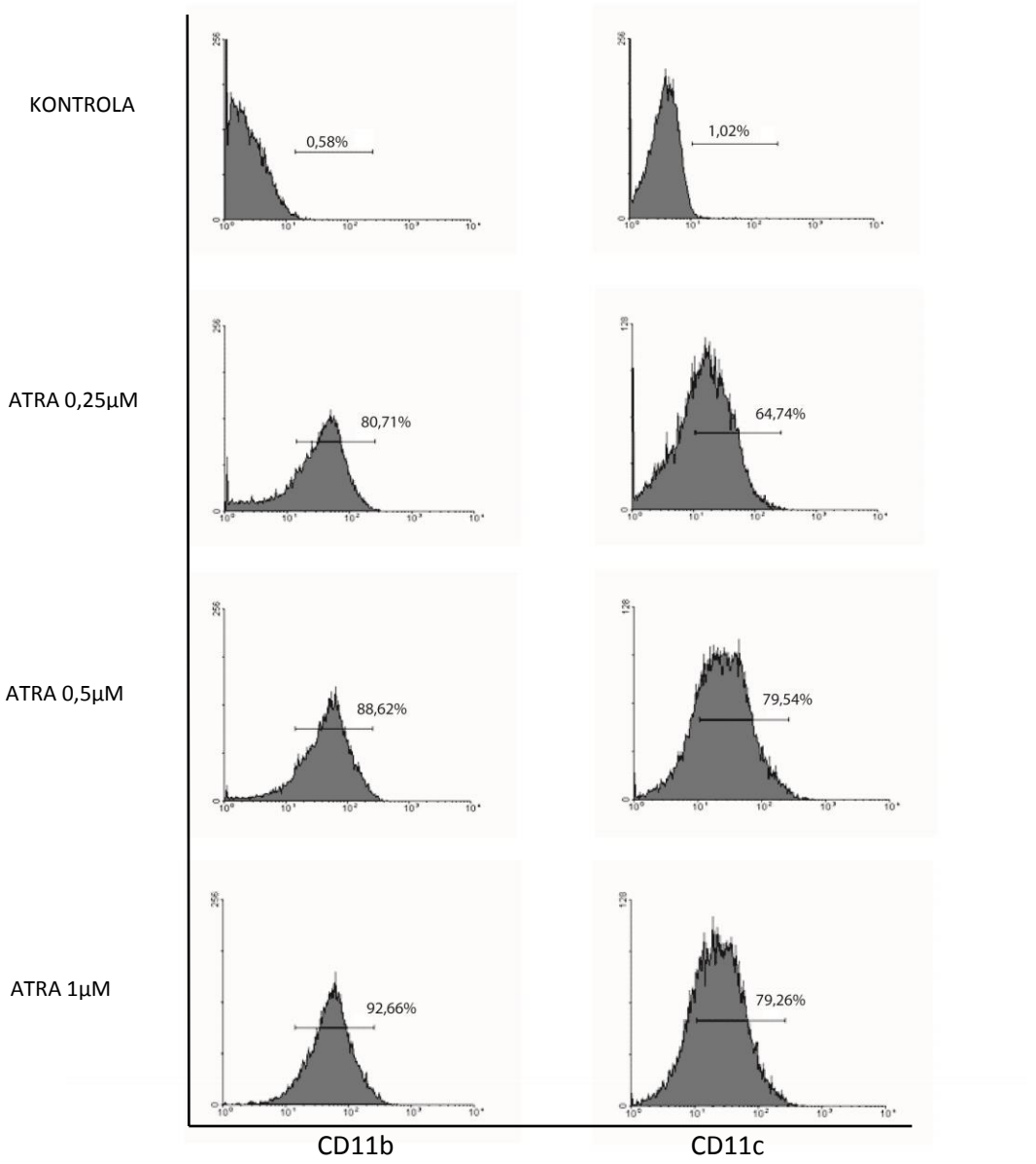
Dosadašnja istraživanja dokazala su da ATRA potiče diferencijaciju stanica mijelodne leukemije (174-176). Kako bismo potvrdili diferencijacijski učinak ATRA-e, stanične linije mijeloidne leukemije NB4 i HL60 obradili smo ATRA-om u različitim dozama tijekom četiri dana. Uzorci obrađeni ATRA-om izražavali su morfološke karakteristike neutrofilnih granulocita (segmentirana jezgra i svijetla citoplazma), za razliku od nediferenciranih promijelocita (okrugla jezgra i bazofilna citoplazma) (Slika 7). Usporedo smo protočno-citometrijski analizirali izražaj diferencijacijskih biljega CD11b i CD11c tijekom obrade stanica. Za liniju NB4 korišten je raspon doza ATRA-e od 0,25 μM do 1 μM, a za liniju HL60 raspon doza od 0,5 μM do 2 μM (Slike 8 i 9). Osim učinka različitih doza, pratili smo i izražaj diferencijacijskih biljega ovisno o trajanju obrade ATRA-om (Slike 10 i 11). U obje stanične linije povećava se udio diferenciranih stanica s vremenom trajanja obrade, odnosno povećanjem koncentracije ATRA-e pa smo za optimalne uvjete diferencijacije koje smo koristili u daljnjim pokusima odredili obradu stanične linije NB4 dozom ATRA-e od 0,5 μM, a linije HL60 dozom ATRA-e od 2 μM.

Dalje smo analizirali učinak ATRA-e na udio apoptotičnih i nekrotičnih stanica linija NB4 i HL60. Uočili smo da se smanjuje udio apoptotičnih stanica NB4 linije tijekom obrade ATRA-om, primjerice na 14,82% treći dan obrade u odnosu na 24,75% u kontrolnom uzorku, dok je udio nekrotičnih stanica približno jednak u svim uzorcima (Slika 12). U liniji HL60 u prvih 48 sati smanjio se udio apoptotičnih stanica na 11,58% u odnosu na 19,05% u kontrolnom uzorku, da bi se nakon 96 sati obrade udio apoptotičnih stanica povećao na 21,59% (Slika 13). Kako u HL60 liniji nije prisutna translokacija t(15;17), odnosno fuzijski protein PML/RARα možemo pretpostaviti da su drugi čimbenici odgovorni za ovakav apoptotični učinak ATRA-e. Poznato je da se tijekom diferencijacije stanica HL60 linije smanjuje izražaj antiapoptotičnog proteina Bcl-2 (177), što bi moglo biti objašnjenje ovog učinka.

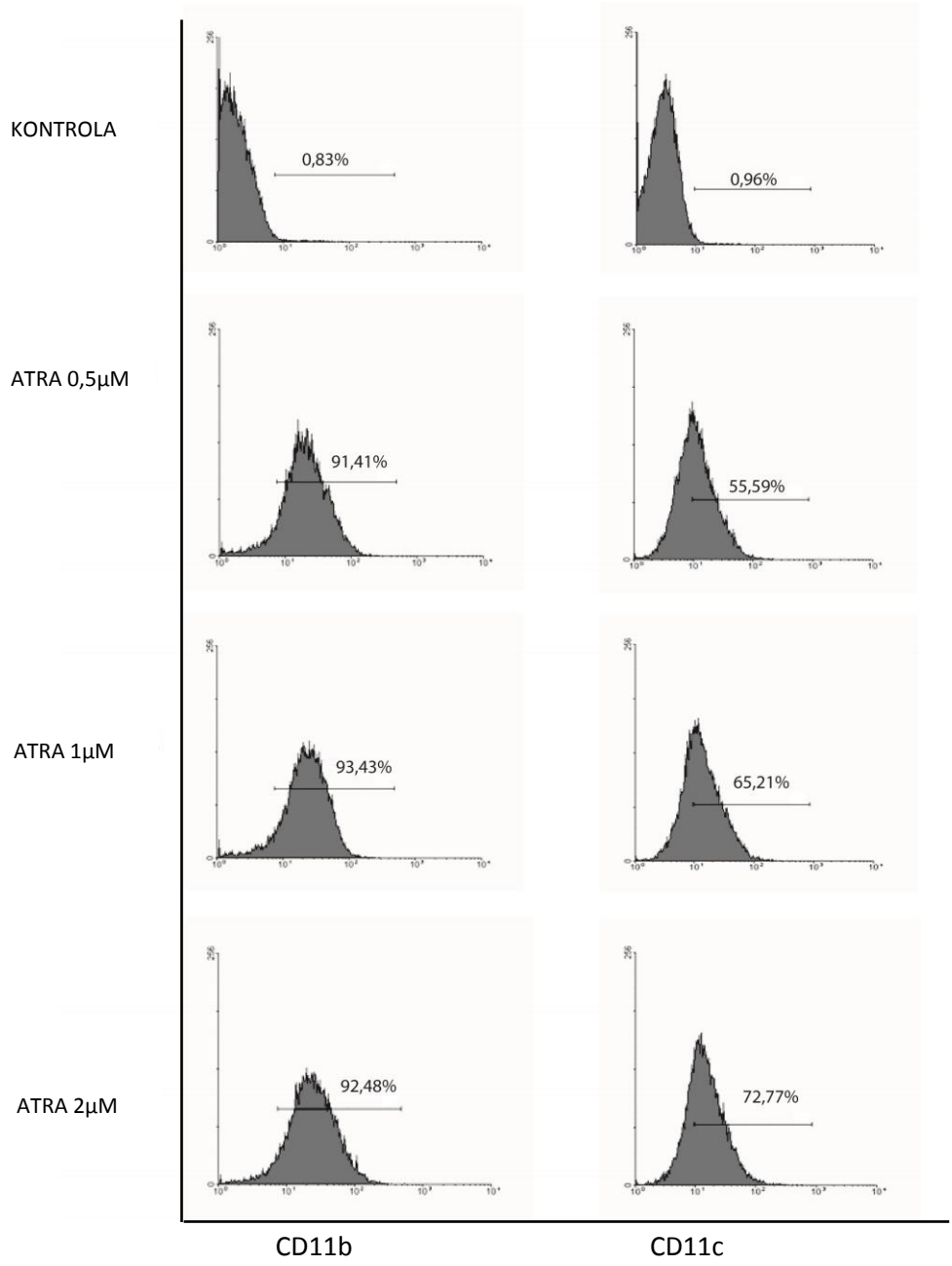
Također smo utvrdili učinak obrade ATRA-om na udio stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa. Obrada ATRA-om smanjenjuje udio stanica u fazama S i G_2/M staničnog ciklusa, primjerice za fazu G_2/M na 4,80% treći dan obrade u odnosu na 11,24% u kontrolnom uzorku za liniju NB4, odnosno na 5,79% četvrti dan obrade u odnosu na 26,83% u kontrolnom uzorku za liniju HL60 (Slike 14 i 15). Kao što smo i očekivali u diferenciranim uzorcima povećao se udio stanica u G_0/G_1 fazi ciklusa u obje stanične linije (176).



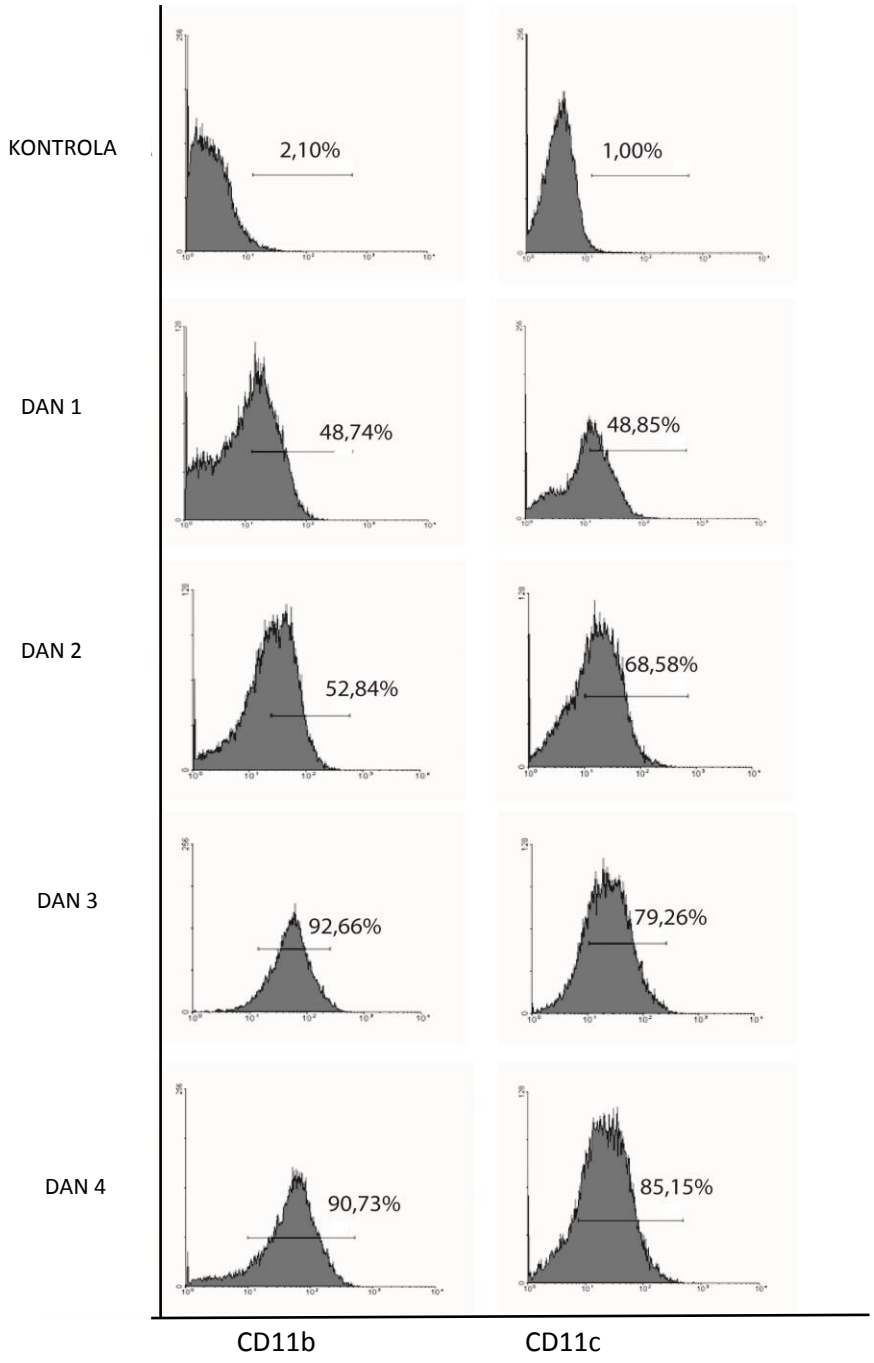
Slika 7. Morfološke promjene stanica mijeloidnih leukemijskih linija NB4 (A) i HL60 (B) nakon obrade ATRA-om. Stanice su pripremljene na predmetnim stakalcima i bojane postupkom po May-Grunwald Giemsi. Stanice linije NB4 analizirane su nakon 3 dana, a stanice linije HL60 nakon 4 dana obrade ATRA-om. U kontrolnoj neobrađenoj skupini prevladavaju nediferencirani promijelociti, dok u obrađenim uzorcima stanica prevladavaju stanice segmentiranih jezgara i svijetle citoplazme, što su značajke diferenciranih neutrofila (strelice). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Povećanje 1000× s uljnom imerzijom. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



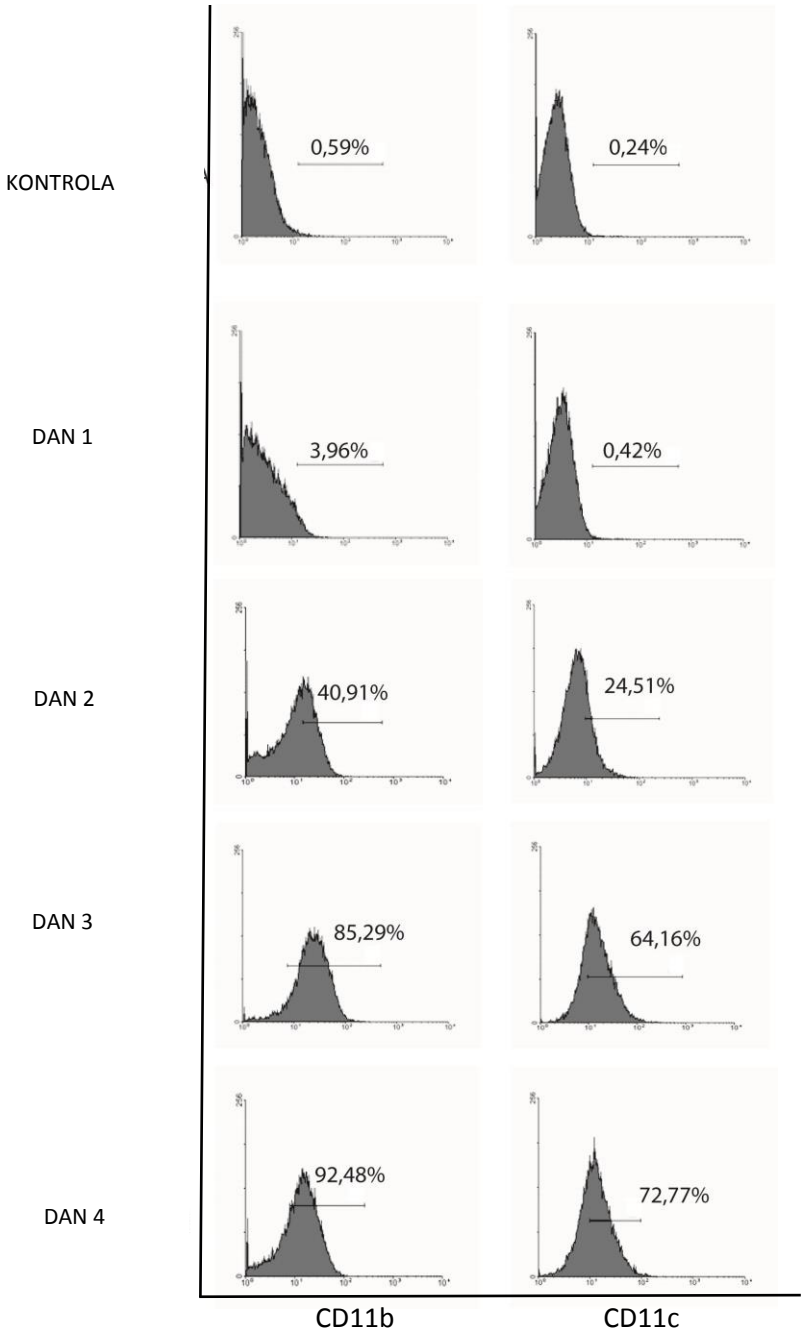
Slika 8. Učinak različitih doza ATRA-e na izražaj membranskih biljega znakovitih za diferencirane neutrofile mijeloidne leukemijske linije NB4. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om tijekom tri dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice NB4 koje nisu obrađene ATRA-om. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



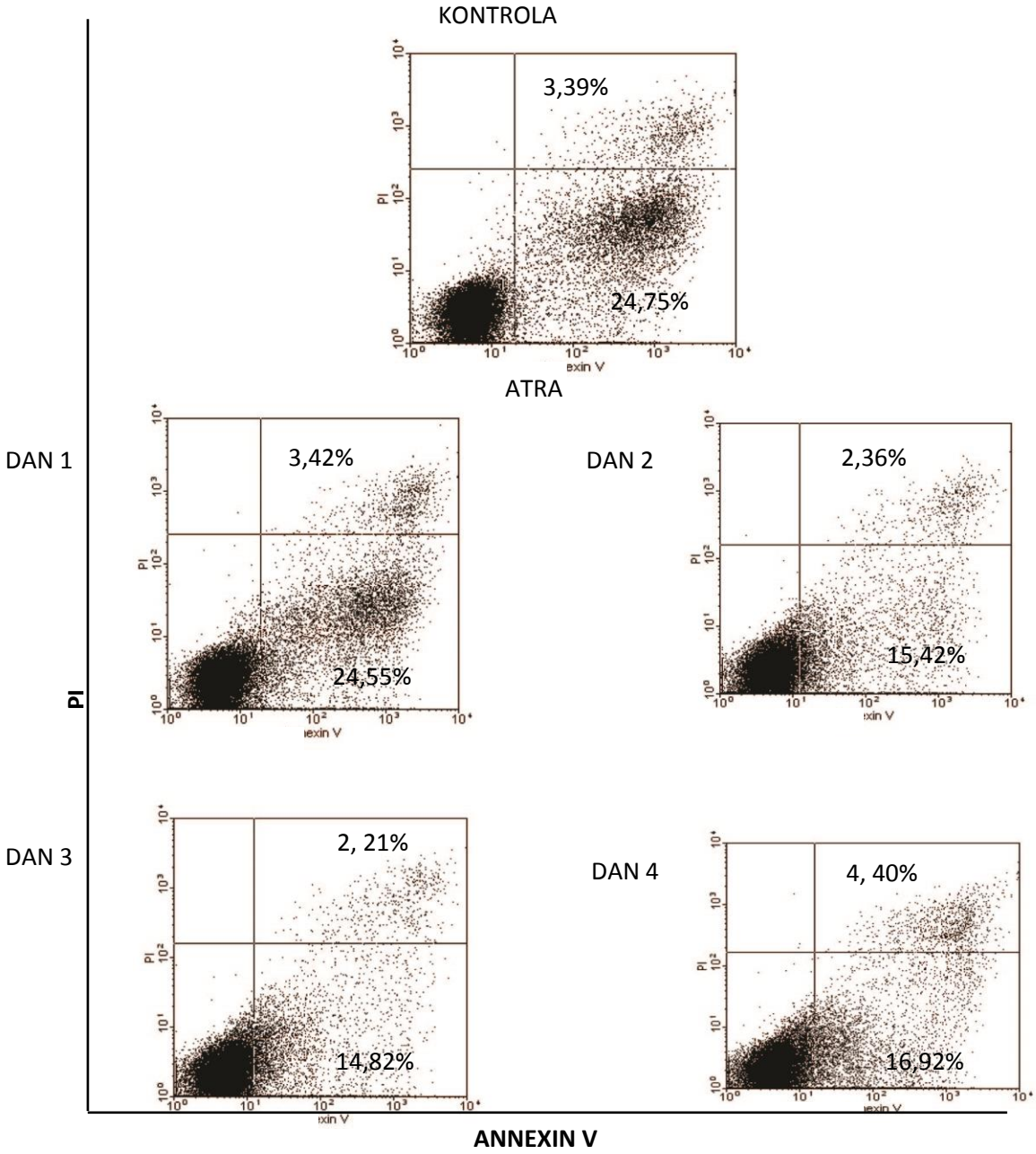
Slika 9. Učinak različitih doza ATRA-e na izražaj membranskih biljega znakovitih za diferencirane neutrofile mijeloidne leukemijske linije HL60. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om tijekom četiri dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice HL60 koje nisu obrađene ATRA-om. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



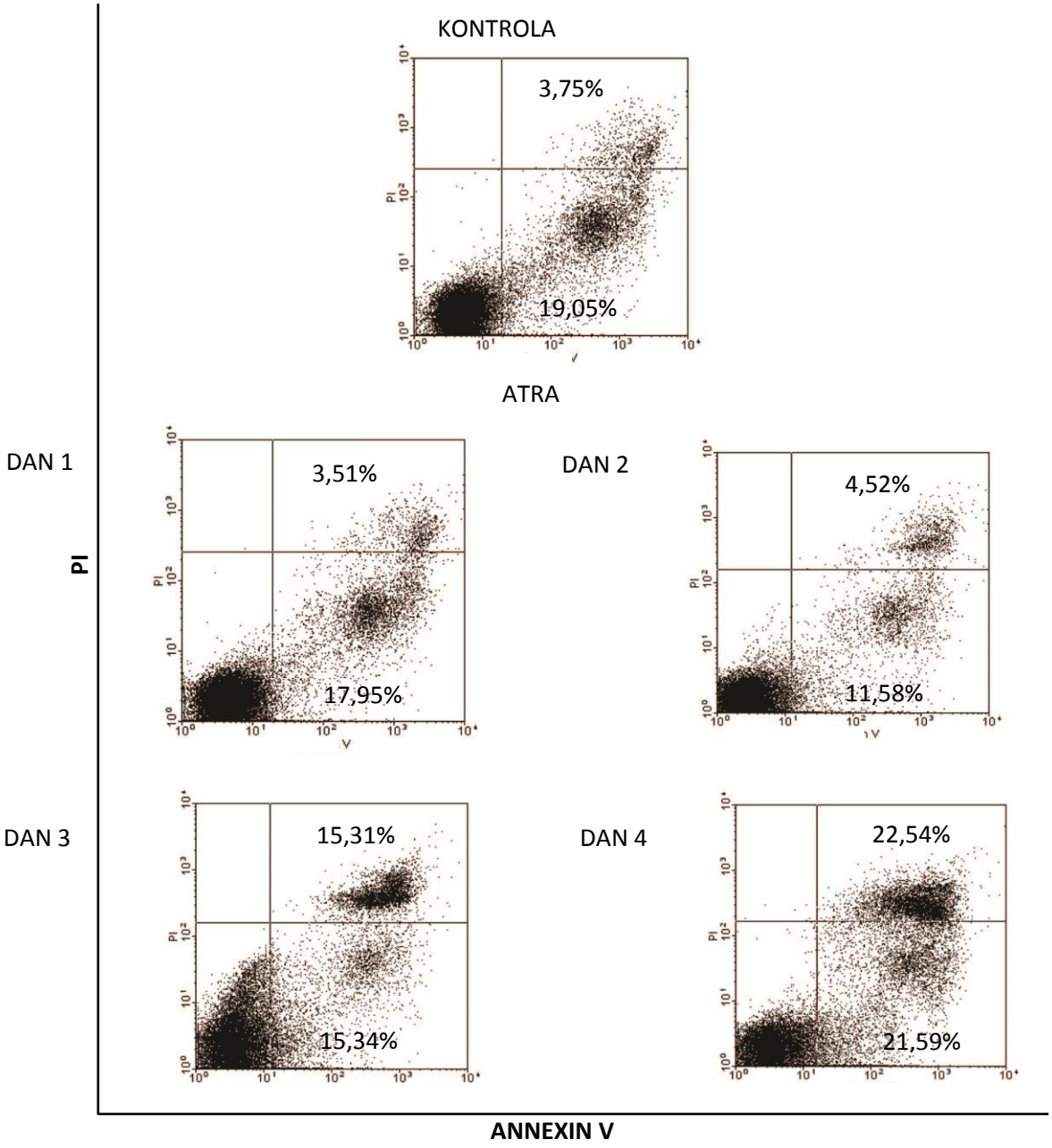
Slika 10. Učinak trajanja obrade ATRA-om na izražaj membranskih biljega karakterističnih za diferencirane neutrofile u staničnoj liniji NB4. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om u dozi od 0,5 μM tijekom četiri dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice NB4 koje nisu obrađene ATRA-om. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



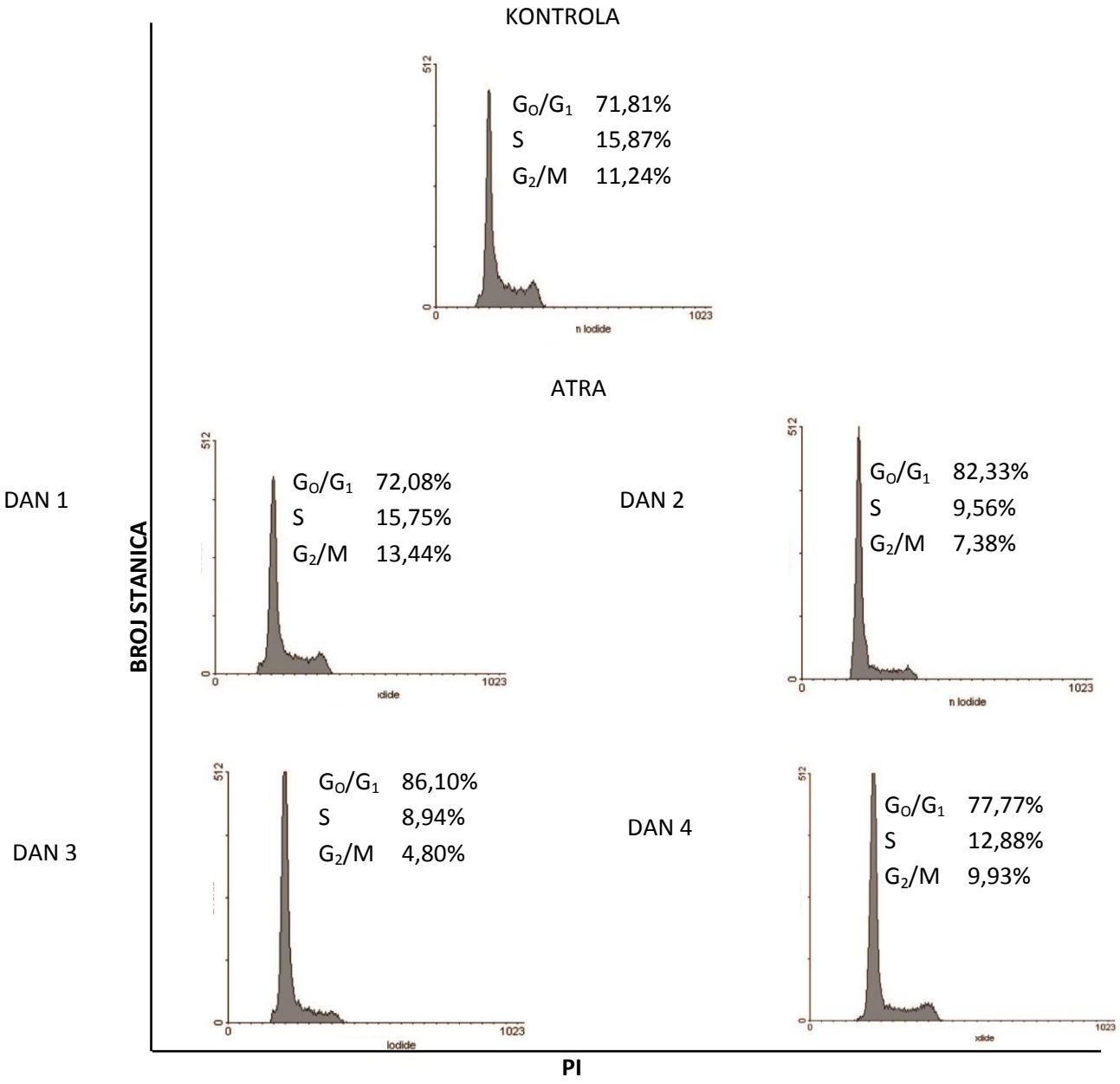
Slika 11. Učinak trajanja obrade ATRA-om na izražaj membranskih biljega karakterističnih za diferencirane neutrofile u staničnoj liniji HL60. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om u dozi od 2 μM tijekom četiri dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice HL60 koje nisu obrađene ATRA-om. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



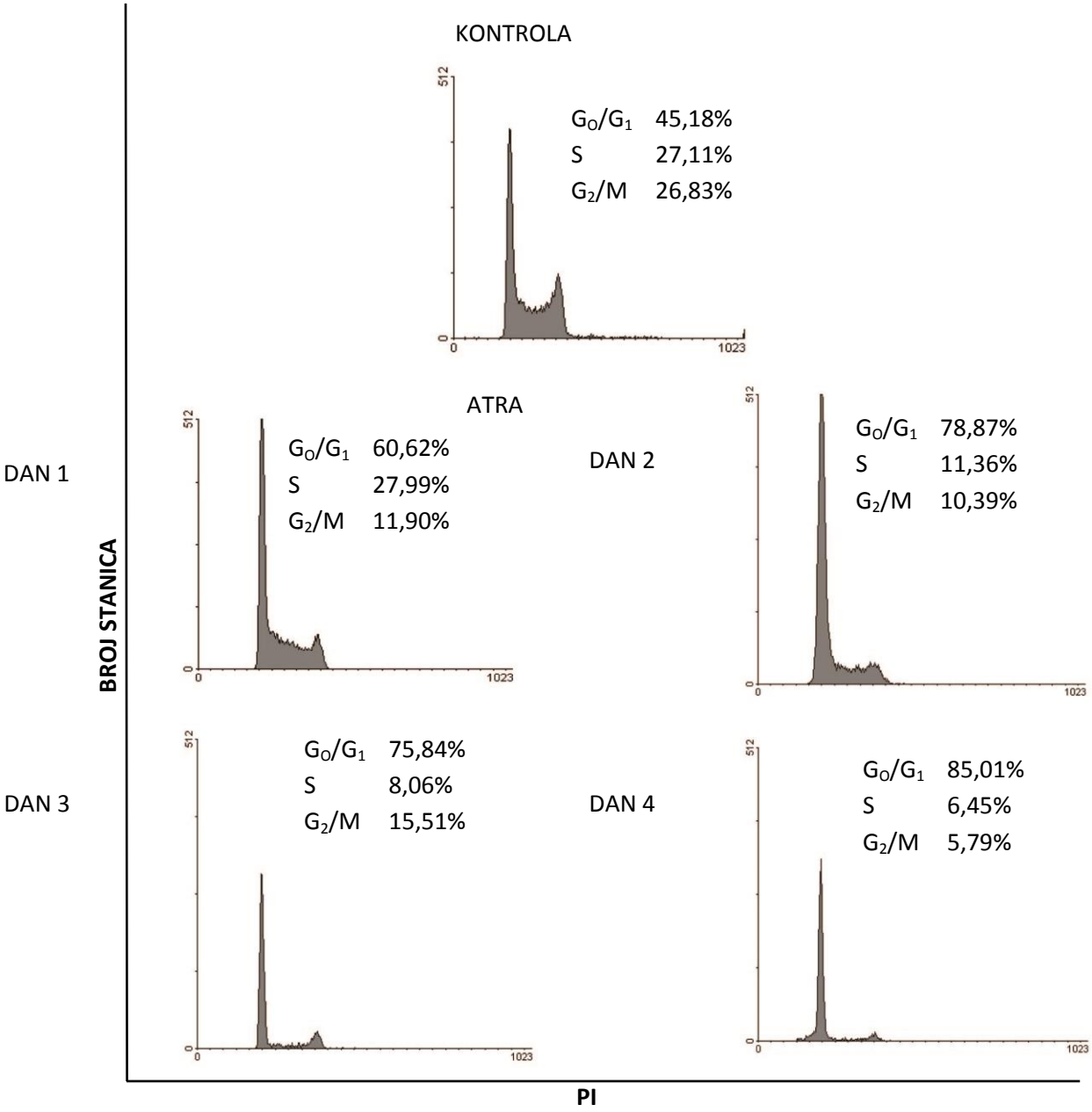
Slika 12. Učinak trajanja obrade ATRA-om na vijabilnost i apoptozu stanica mijeloidne leukemijske linije NB4. Protočnom citometrijom analiziran je udio apoptotičnih i nekrotičnih stanica nakon obrade ATRA-om u dozi od 0,5 μM tijekom četiri dana. Istodobnim bojanjem stanica fluorescein-izotiocijanat (FITC)-Annexin V i propidij jodidom (PI) razlikujemo intaktne stanice ($FITC^-$, PI^-), apoptotične ($FITC^+$, PI^-) i nekrotične stanice ($FITC^+$, PI^+). Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali točkastim grafikonom odnosa intenziteta fluorescencije FITC i PI. Za postavljanje ograda i određivanje udjela pozitivnih stanica korišteni su neoznačeni uzorci i uzorci označeni pojedinačnim fluorescencijama (FITC i PI). Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



Slika 13. Učinak trajanja obrade ATRA-om na vijabilnost i apoptozu stanica mijeloidne leukemijske linije HL60. Protočnom citometrijom analiziran je udio apoptotičnih i nekrotičnih stanica nakon obrade ATRA-om u dozi od 2 μM tijekom četiri dana. Istodobnim bojanjem stanica fluorescein-izotiocijanat (FITC)-Annexin V i propidij jodidom (PI) razlikujemo intaktne stanice ($FITC^-$, PI^-), apoptotične ($FITC^+$, PI^-) i nekrotične stanice ($FITC^+$, PI^+). Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali točkastim grafikonom odnosa intenziteta fluorescencije FITC i PI. Za postavljanje ograda i određivanje udjela pozitivnih stanica korišteni su neoznačeni uzorci i uzorci označeni pojedinačnim fluorescencijama (FITC i PI). Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*



Slika 14. Učinak obrade ATRA-om na razdiobu stanica mijeloidne leukemijske linije NB4 prema fazama staničnog ciklusa. Stanice su obrađene ATRA-om u dozi od 0,5 μM tijekom četiri dana i bojane Vindelovom bojom. Faze staničnog ciklusa G_0/G_1, S i G_2/M prikazane su pomoću histograma odnosa intenziteta fluorescencije PI (odnosno stanične količine DNA) i broja stanica. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, PI, propidij jodid

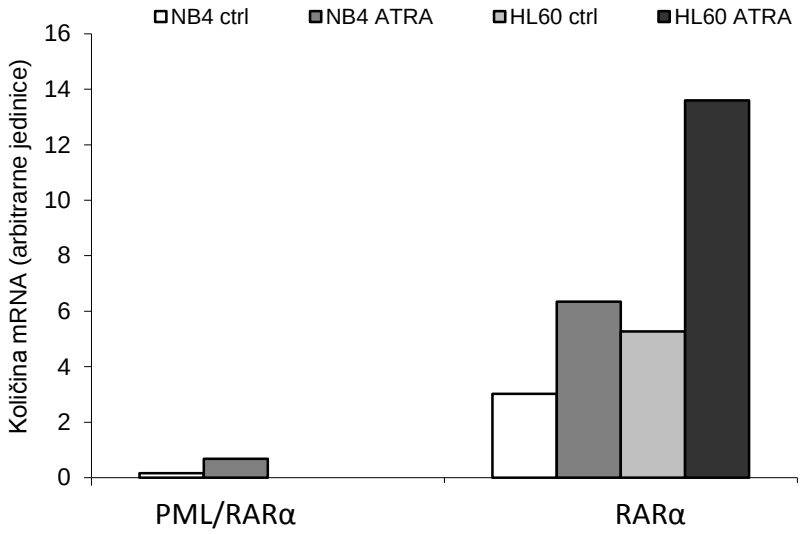


Slika 15. Učinak obrade ATRA-om na razdiobu stanica mijeloidne leukemijske linije HL60 prema fazama staničnog ciklusa. Stanice su obrađene ATRA-om u dozi od 2 μM tijekom četiri dana i bojane Vindelovom bojom. Faze staničnog ciklusa G_0/G_1, S i G_2/M prikazane su pomoću histograma odnosa intenziteta fluorescencije PI (odnosno stanične količine DNA) i broja stanica. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, PI, propidij jodid

Izražaj onkogena PML/RARα i ukupnog receptora RARα u mijeloidnom leukemijskim linijama NB4 i HL60

Promjene u diferencijaciji, apoptozi i staničnom ciklusu mijeloidnih leukemijskih linija, izazvane obradom ATRA-om potvrdili smo i promjenama u izražaju pojedinih gena ključnih za djelovanje ATRA-e i BMP-a postupkom kvantitativnog PCR-a.

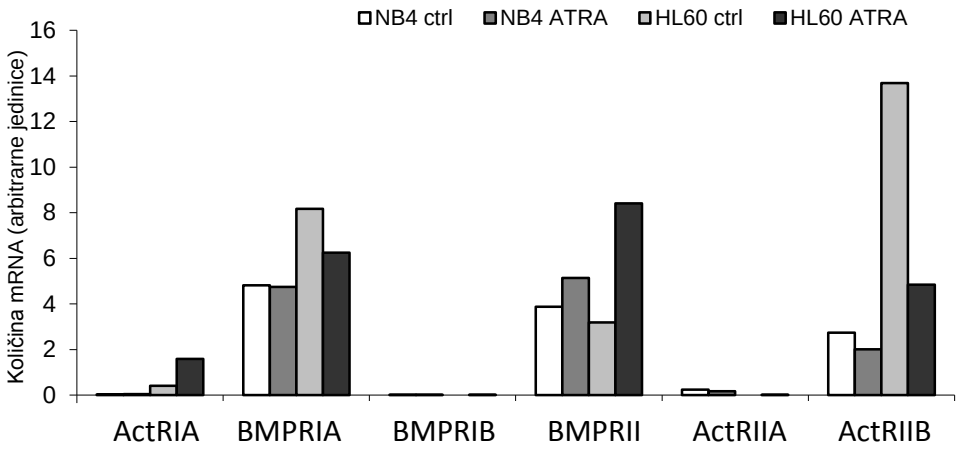
U prvom nizu pokusa odredili smo izražaj receptora retinoične kiseline RARα i fuzijskog onkogena PML/RARα u odnosu na obradu ATRA-om. U staničnoj liniji NB4, za koju je karakteristična prisutnost translokacije t(15;17), izražaj onkogena PML/RARα povećan je nakon obrade stanica ATRA-om (Slika 16). Kao što smo i očekivali, u liniji HL60 koja nema translokaciju t(15;17), onkogen PML/RARα nije prisutan. U obje mijeloidne leukemijske linije nakon obrade stanica ATRA-om povećava se izražaj gena za RARα.



Slika 16. Izražaj onkogena PML/RARα i receptora retinoične kiseline RARα u mijeloidnim leukemijskim linijama NB4 i HL60 nakon obrade ATRA-om. RNA je izolirana iz uzoraka staničnih linija nakon obrade ATRA-om tijekom dva (NB4) odnosno tri (HL60) dana i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om.Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. PML/RARα, prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoid receptor α,* receptor retinoične kiseline RARα, prema engl. *retinoid receptor α*, ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, ctrl, kontrola**.**

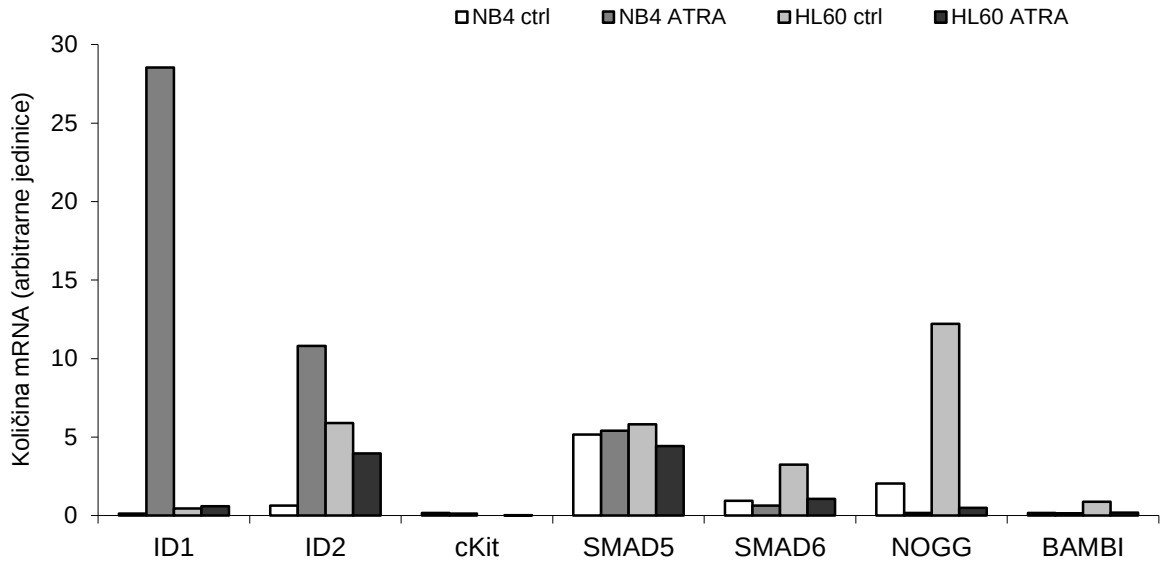
Izražaj gena za BMP-receptore, BMP-ciljne molekule, molekule BMP-signalnog puta i BMP-antagoniste u mijeloidnim leukemijskim linijama NB4 i HL60

Da bi potvrdili osjetljivost mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 na molekule BMP odredili smo izražaj gena za BMP-receptore u tim stanicama. Analiziran je izražaj BMP-receptora skupine I: ActRIA, BMPRIA, BMPRIB i skupine II: BMPRII, ActRIIA, ActRIIB. U obje stanične linije poglavito su izraženi geni za receptor BMPRIA, te iz receptora skupine II BMPRII i ActRIIB. Djelovanjem ATRA-e najuočljivije je pojačanje izražaja gena za BMPRII i smanjenje izražaja gena za ActRIIB, izraženije u staničnoj liniji HL60 (Slika 17).



Slika 17. Izražaj receptora za molekule BMP u mijeloidnim leukemijskim linijama NB4 i HL60 nakon obrade stanica ATRA-om. RNA je izolirana iz uzoraka staničnih linija nakon obrade ATRA-om tijekom dva (NB4) odnosno tri (HL60) dana i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om. Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena“ kontrola). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein,* ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, ActRIA, prema engl. *activin receptor IA*, BMPRIA, prema engl. *bone morphogenetic protein receptor IA,* BMPRIB, prema engl. *bone morphogenetic protein receptor IB,* BMPRII, prema engl. *bone morphogenetic protein receptor II,* ActRIIA, prema engl. *activin receptor IIA,* ActRIIB, prema engl. *activin receptor IIB,* ctrl, kontrola

Osim izražaja gena za BMP-receptore, analizirali smo i izražaj gena za molekule uključene u BMP-signalni put (SMAD-5, SMAD-6), izražaj BMP-antagonista (NOGGIN, BAMBI) te gena čiju transkripciju reguliraju molekule BMP i koji su važni za njihov unutarstanični učinak (ID1, ID2 i cKit) (Slika 18). Izražaj gena za inhibitore diferencijacije ID1 i ID2 izrazito se povećava nakon obrade ATRA-om u stanicama linije NB4. Također smo uočili smanjenje izražaja gena za inhibicijsku molekulu SMAD-6 i BMP-antagonist NOGGIN nakon obrade ATRA-om u obje stanične linije.



Slika 18. Izražaj gena za BMP-ciljne molekule (ID1, ID2, cKit), molekule BMP-signalnog puta (SMAD-5, SMAD-6) i BMP-antagoniste (NOGGIN i BAMBI) u mijeloidnim leukemijskim linijama NB4 i HL60 nakon obrade ATRA-om. RNA je izolirana iz uzoraka staničnih linija nakon obrade ATRA-om tijekom dva (NB4) odnosno tri (HL60) dana i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om.Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena“ kontrola). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, SMAD, prema engl. *small mothers against decapentaplegic*, ID, prema engl. *inhibitors of DNA binding*, NOGG, NOGGIN, BAMBI, prema engl. *bone morphogenetic and activin membrane-bound inhibitor*

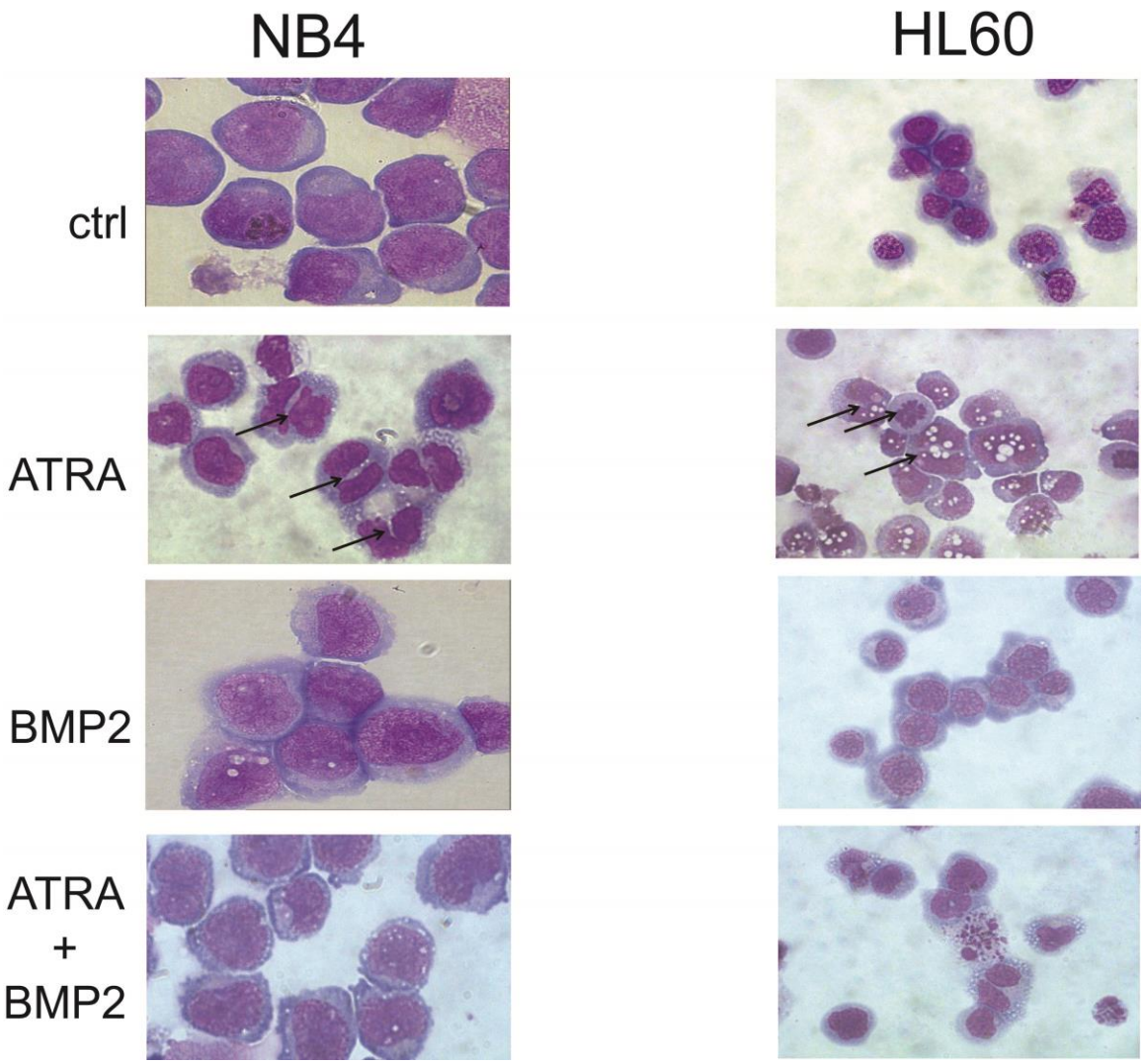
5.2. Koštani morfogenetski proteini smanjuju diferencijaciju mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 potaknutu ATRA-om

Prethodnim istraživanjima naše skupine pokazali smo smanjen izražaj gena za BMP-2, BMP-4 i BMP-7 u uzorcima koštane srži bolesnika oboljelih od APL nakon liječenja ATRA-om u odnosu na dijagnostičke uzorke (153). Na temelju tih rezultata zaključili smo da molekule BMP sudjeluju u regulaciji diferencijacije stanica APL. U ovoj studiji dalje smo istraživali taj mehamizam u uvjetima *in vitro* koristeći mijeloidne leukemijske linije NB4 i HL60. Obje stanične linije na obradu ATRA-om odgovaraju diferencijacijom promijelocita u neutrofile. NB4 je akutna promijelocitna stanična linija karakterizirana translokacijom t(15;17) i onkogenom PML/RARα, dok je HL60 linija mijeloblastične leukemije, koja nema translokaciju t(15;17) niti onkogen PML/RARα, a koristili smo je kako bi testirali je li učinak BMP-a ovisan o izražaju onkogena PML/RARα.

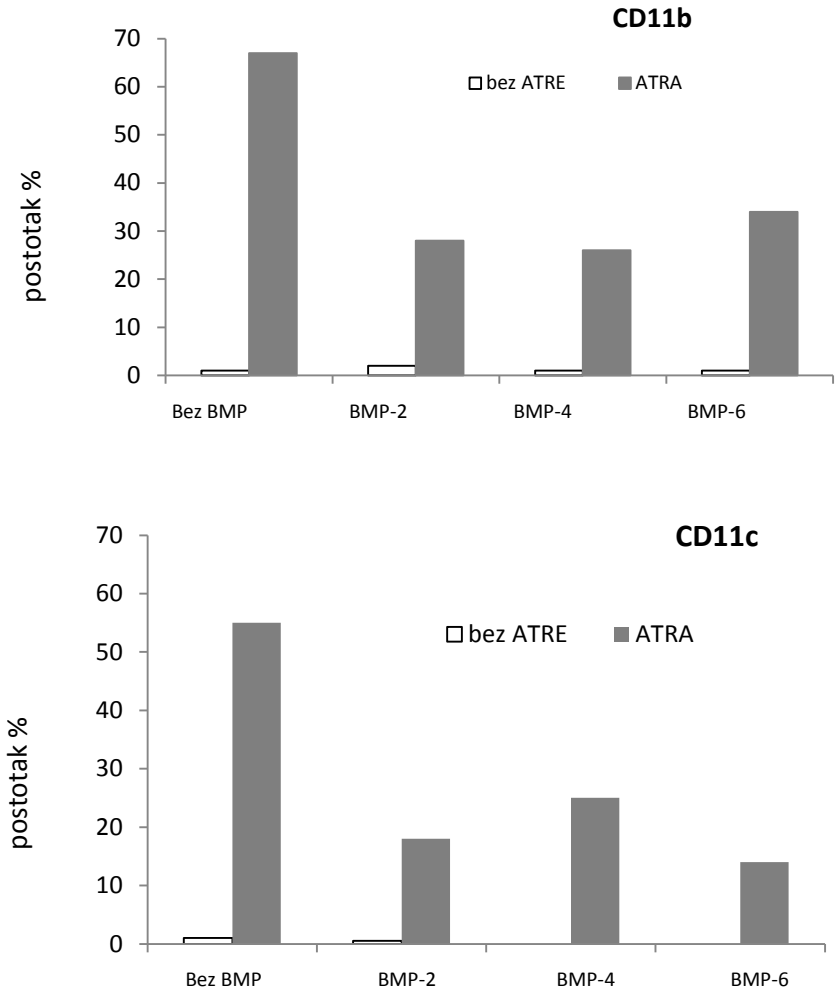
Stanične kulture obradili smo ATRA-om u dozi od 0,5 μM za stanice NB4 i 2 μM za stanice HL60 te BMP-2, BMP-4 ili BMP-6 u dozi od 25 ng/ml. Obrada stanica samo molekulama BMP-2, -4 ili -6 ne djeluje na diferencijaciju stanica prema morfološkim i fenotipskim pokazateljima. Nasuprot tome, kombinirana obrada ATRA-om i molekulama BMP značajno smanjuje udio diferenciranih stanica u odnosu na uzorke obrađene samo ATRA-om.

Taj učinak najprije smo dokazali na temelju morfoloških promjena tijekom diferencijacije promijelocita u neutrofile, u uzorcima obojanim prostupkom May-Grunwald Giemsa (Slika 19). Stanice koje su obrađene kombinacijom ATRA-e i BMP-a pokazivale su morfološka obilježja promijelocita, slično kontrolnim neobrađenim stanicama, nasuprot diferenciranim stanicama značajki neutrofila u uzorcima obrađenim ATRA-om.

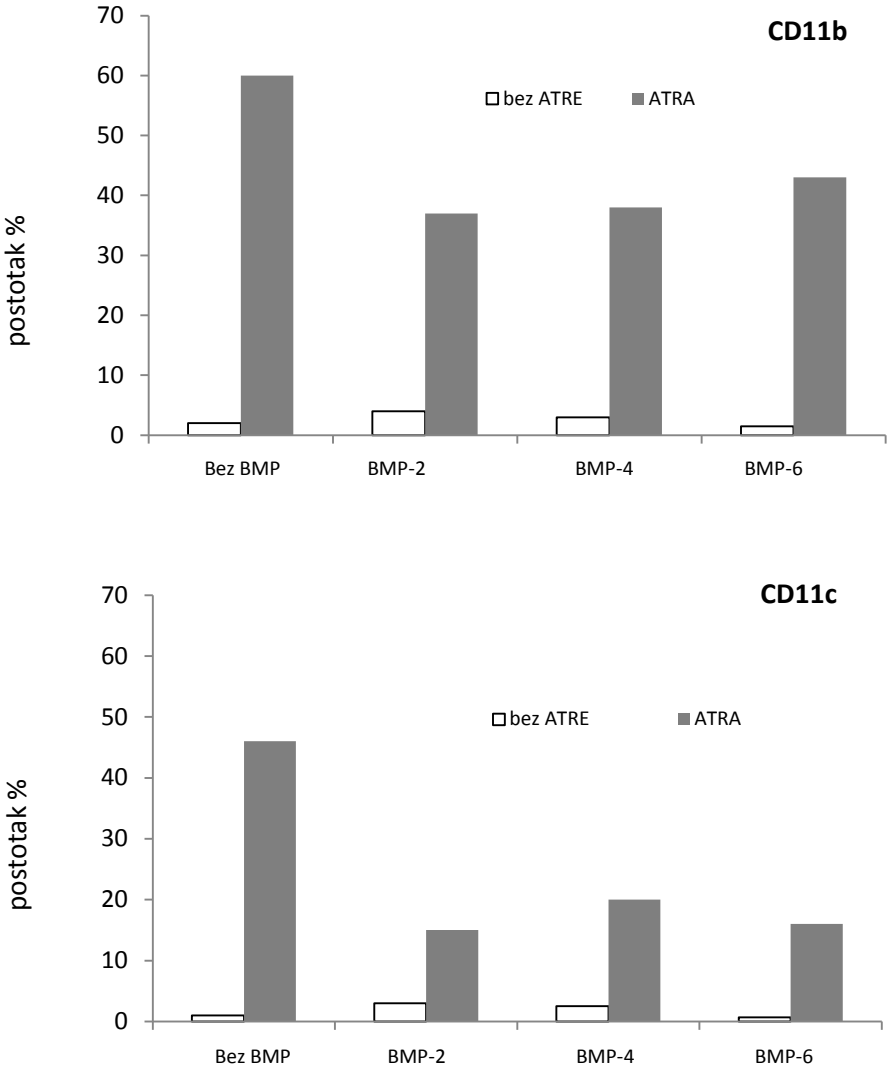
Izražaj membranskih diferencijacijskih biljega, analiziran protočno-citometrijski, u skladu je s morfološkim pokazateljima. Uočili smo otprilike dvostruko smanjenje udjela $CD11b^+$ i još izraženije smanjenje udjela $CD11c^+$ stanica linije NB4 (Slika 20). Stanice linije HL60 pokazuju sličan obrazac odgovora na kombiniranu obradu uz nešto slabiji učinak na izražaj biljega CD11b u odnosu na liniju NB4 (Slika 21). Također, nije uočena značajna razlika u učinku različitih molekula BMP.



Slika 19. Učinak kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP-2 na morfološke značajke mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60. Stanice su pripremljene na predmetnim stakalcima, a potom su bojane postupkom May-Grunwald Giemsa. Stanice linije NB4 analizirane su nakon tri dana, a stanice linije HL60 nakon četiri dana obrade. Kontrolnu skupinu predstavljaju neobrađene stanice značajki nediferenciranih promijelocita. Strelice označavaju diferencirane neutrofile, znakovite po segmentiranim jezgrama i svijetloj citoplazmi. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Povećanje 1000× s uljnom imerzijom. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*



Slika 20. Učinak kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP na izražaj membranskih biljega znakovitih za diferencirane neutrofile u mijeloidnoj leukemijskoj liniji NB4. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om u dozi od 0,5 μM i molekulama BMP-2, BMP-4 i BMP-6 u dozi od 25 ng/ml tijekom tri dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice NB4 koje nisu obrađene ATRA-om ili molekulama BMP. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Grafikoni prikazuju postotak stanica koje izražavaju površinski biljeg. Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP prema engl. *bone morphogenetic protein*



Slika 21. Učinak kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP na izražaj membranskih biljega znakovitih za diferencirane neutrofile u mijeloidnoj leukemijskoj liniji HL60. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om u dozi od 2 μM i molekulama BMP-2, BMP-4 i BMP-6 u dozi od 25 ng/ml tijekom četiri dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice HL60 koje nisu obrađene ATRA-om ili molekulama BMP. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Grafikoni prikazuju postotak stanica koje izražavaju površinski biljeg. Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP prema engl. *bone morphogenetic protein*

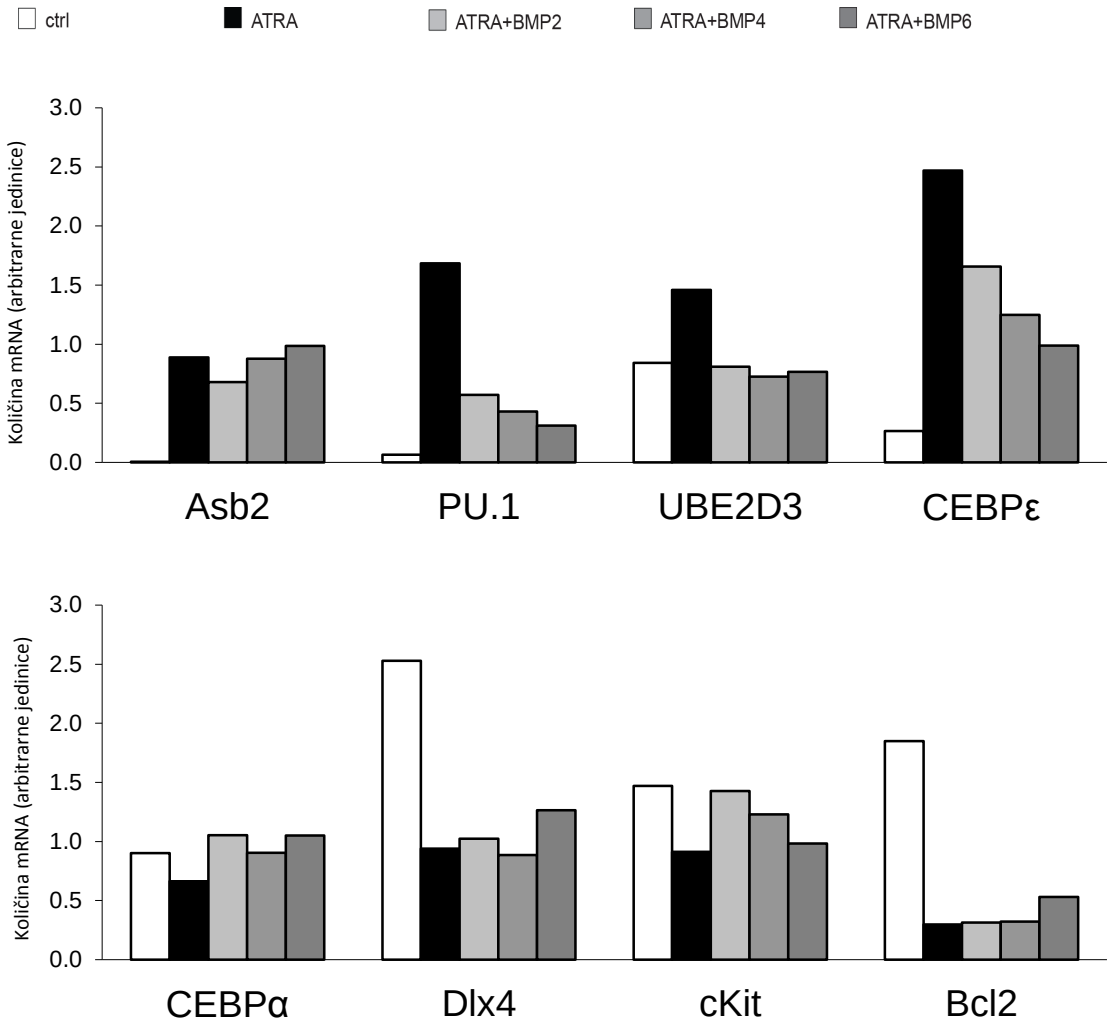
Izražaj unutarstaničnih gena odgovornih za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 nakon kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP

Da bi na molekularnoj razini potvrdili učinak ATRA-e te kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP, u sljedećem nizu pokusa postupkom qPCR analizirali smo izražaj unutarstaničnih gena koji su odgovorni za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica APL (Slike 22 i 23). Ciljne gene grupirali smo u dvije skupine, tako da prvu skupinu čine geni čiji se izražaj pojačava nakon obrade ATRA-om odnosno diferencijacijom promijelocita u neutrofile, a drugu skupinu čine geni izraženi u nediferenciranim stanicama, čiji se izražaj djelovanjem ATRA-e smanjuje.

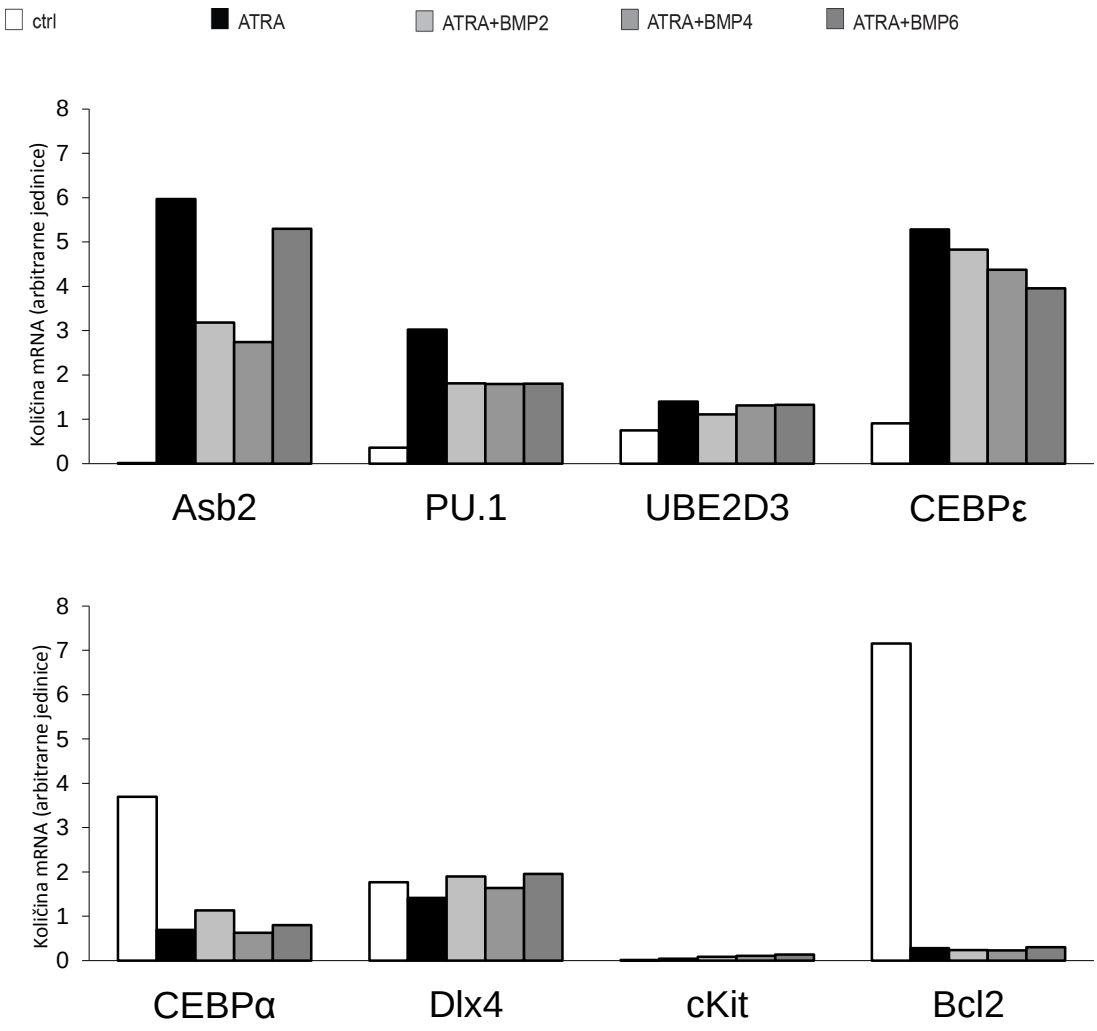
U prvoj skupini analizirali smo izražaj gena Asb2 (prema engl. *ankirin repeat i SOCS box protein*) koji je odgovoran za inhibiciju rasta i mijeloidnu diferencijaciju djelovanjem RA. Izražaj tog gena značajno se povećao u uzorcima obrađenim ATRA-om. Potom smo pratili izražaj gena važnih za diferencijaciju stanica: gena za mijeloidni specifični transkripcijski čimbenik PU.1 i transkripcijski čimbenik C/EBP ε (prema engl. *CCAT-enhancer-binding protein ε*) te ubikvitin-konjugirajući enzim UBE2D3 (prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3*). Izražaj tih gena višestruko se povećava u uzorcima obrađenim ATRA-om. Kombinirana obrada ATRA-om i molekulama BMP smanjuje poticajni učinak ATRA-e na transkripciju tih gena, posebice u stanicama linije NB4 (Slike 22 i 23).

U drugoj skupini analizirali smo izražaj gena koji sudjeluju u staničnoj proliferaciji i tumorigenezi uključujući protoonokogen Bcl-2 (prema engl. *B-cell lymphoma-2*), cKit (prema engl. *tyrosine-protein kinase*) i Dlx4 (prema engl. *distal-less homebox gene 4*). Izražaj tih gena,

posebice Bcl-2, smanjuje se djelovanjem ATRA-e, bez značajnog učinka dodatne obrade molekulama BMP. Zanimljivo je istaknuti da je izražaj gena za cKit, koji ima važnu ulogu u regulaciji proliferaciji hematopoetskih stanica, vrlo slabo izražen u stanicama linije HL60, a značajno jače izražen u stanicama linije NB4 (Slike 22 i 23). Pretpostavljamo da bi ta razlika u konstitutivnom izražaju gena za cKit koji je jedan od transkripcijskih ciljeva molekula BMP, mogla biti odgovorna za jači supresijski učinak BMP-a na diferencijaciju stanica NB4 potaknutu ATRA-om u odnosu na stanice HL60. Ukupno gledano, molekule BMP su značajnije mijenjale izražaj gena odgovornih za diferencijaciju stanica primjerice PU.1, UBE2D3 i C/EBPε, posebice u stanicama linije NB4, u odnosu na izražaj gena uključenih u regulaciju proliferacije stanica.



Slika 22. Izražaj unutarstaničnih gena ključnih za regulaciju diferencijacije (Asb2, PU.1, UBE2D3, CEBPε) i proliferacije (CEBPα, Dlx4, cKit i Bcl-2) stanica NB4 nakon kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP. RNA je izolirana iz uzoraka linije NB4 nakon dva dana kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om ili molekulama BMP. Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, ctrl, kontrola, Asb2, prema engl. *ankyrin repeat and SOCS box protein 2*, C/EBP, prema engl. *CCAAT-enhancer-binding-proteins*, UBE2D3, prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme* 2D3, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*, Bcl-2, prema engl. *B-cell lymphoma-2*, Dlx4, prema engl. *distal-less homebox* 4



Slika 23. Izražaj unutarstaničnih gena ključnih za regulaciju diferencijacije (Asb2, PU.1, UBE2D3, CEBPε) i proliferacije (CEBPα, Dlx4, cKit i Bcl-2) stanica HL60 nakon kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP. RNA je izolirana iz uzoraka linije HL60 nakon tri dana kombinirane obrade ATRA-om i molekulama BMP i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om ili molekulama BMP. Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, ctrl, kontrola, Asb2, prema engl. *ankyrin repeat and SOCS box protein 2*, C/EBP, prema engl. *CCAAT-enhancer-binding-proteins*, UBE2D3, prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme* 2D3, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*, Bcl-2, prema engl. *B-cell lymphoma-2*, Dlx4, prema engl. *distal-less homebox* 4

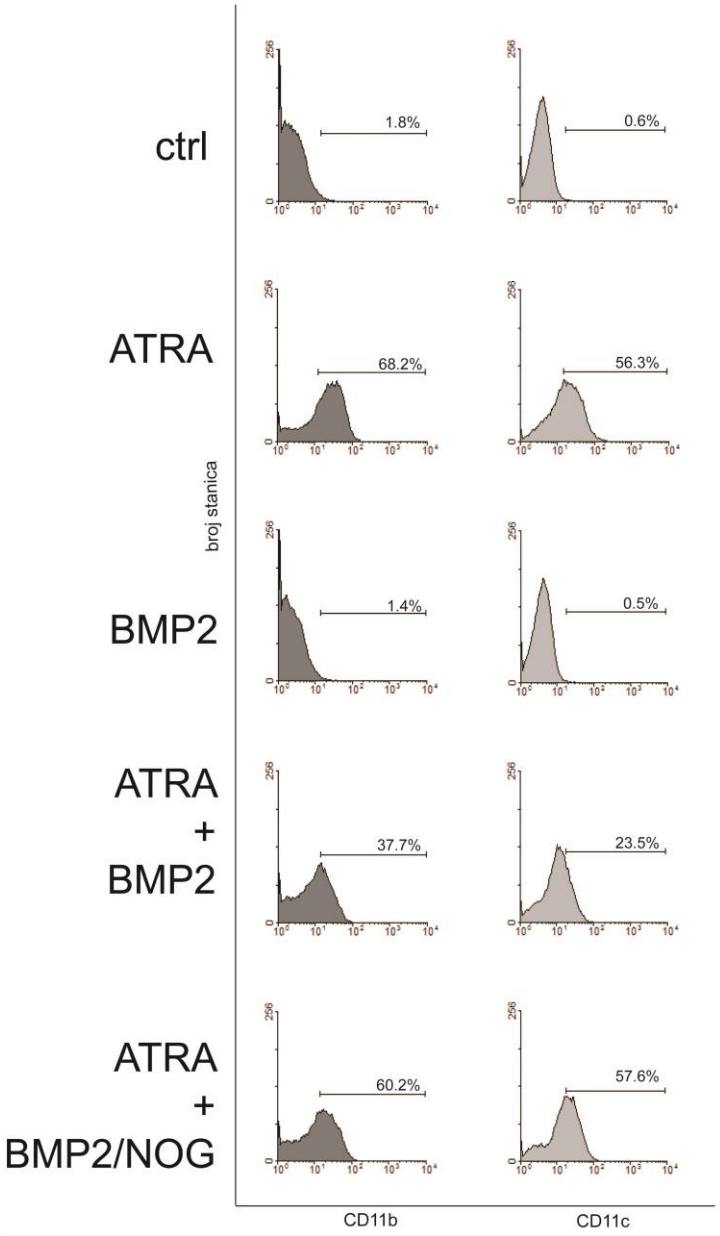
5.3. Djelovanje molekula BMP-2 i NOGGIN na mijeloidne leukemijske linije NB4 i HL60 nakon obrade ATRA-om

Cilj sljedećeg niza pokusa bio je potvrditi specifični anti-diferencijacijski učinak molekula BMP, te razjasniti molekularni mehanizam toga učinka odnosno identificirati gene na čiju transkripciju djeluju molekule BMP i koji bi mogli biti odgovorni za sprječavanje diferencijacije promijelocita potaknute ATRA-om. U prethodnim pokusima nismo uočili značajne razlike u djelovanju pojedinih molekula BMP. Kako su u obje ispitivane stanične linije izraženi receptori BMPRIA, BMPRII i ActRIIB (Slika 17) preko kojih svoj učinak mogu ostvariti sve tri ispitivane BMP-molekule (BMP-2, BMP-4 i BMP-6) (178-180), pretpostavili smo da su ta tri receptora odgovorna za provođenje BMP-signala. Stoga smo u daljnjim pokusima za istraživanje mehanizma djelovanja molekula BMP na diferencijaciju promijelocita potaknutu ATRA-om uporabili BMP-2.

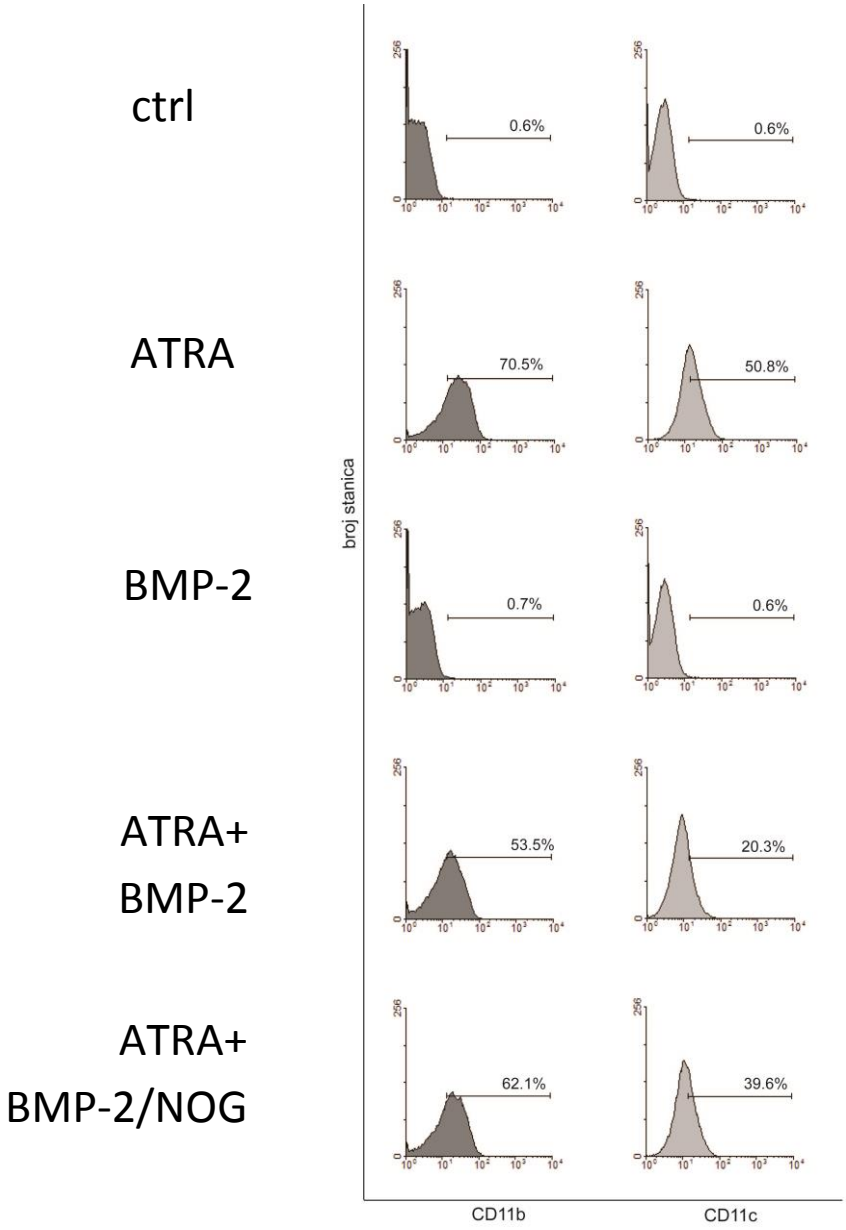
Potvrdili smo smanjenje udjela diferenciranih stanica nakon kombinirane obrade stanica ATRA-om i molekulom BMP-2 u odnosu na obradu samo ATRA-om (Slike 24 i 25). Također smo dokazali da je taj učinak supresije diferencijacije potaknute ATRA-om specifično posredovan sa molekulom BMP-2 jer je izostao kada smo tretiranim stanicama dodali BMP-antagonist NOGGIN u obje testirane mijeloidne leukemijske linije. Stanice uzoraka obrađenih kombinacijom molekula BMP-2/NOGGIN i potaknutih ATRA-om izražavali su diferencijacijske biljege CD11b i CD11c slično uzorcima obrađenim samo ATRA-om (Slike 24 i 25).

Dalje smo analizirali izražaj gena za unutarstanične molekule u čijoj regulaciji se isprepliće signalni put BMP-a i ATRA-e te čija je transkripcija regulirana i molekulama BMP i ATRA-om. ID-proteini koji pripadaju obitelji *helix-loop-helix* (HLH)-proteina djeluju kao inhibitori

vezivanja drugih HLH-proteina na DNA. Poznato je da BMP-molekule reguliraju izražaj proteina ID u različitim tkivima (181). Također, uočen je pojačan izražaja ID-gena u bolesnika koji boluju od APL nakon liječenja ATRA-om (182). ID-geni sudjeluju u regulaciji diferencijacije granulocita (183), kao i u malignoj transformaciji različitih tipova stanica (184). U isto vrijeme, ti su geni uključeni u BMP-signalni put (185). Naši rezultati pokazuju pojačan izražaj gena ID1 i ID2 u stanicama obrađenim molekulama BMP-2 u obje mijeloidne leukemijske linije (Slike 26 i 27). U uzorcima obrađenim samo ATRA-om njihov izražaj se pojačava samo u stanicama NB4, ali ne u stanicama HL60. Kombinirana obrada molekulama BMP-2 i ATRA-om aditivno pojačava izražaj ID-gena, posebice ID1 u stanicama NB4 (Slike 26 i 27). Ti rezultati upućuju na zaključak da bi dodatna indukcija djelovanja ID-proteina molekulama BMP mogla biti uzrok kočenja diferencijacije promijelocita potaknute ATRA-om.

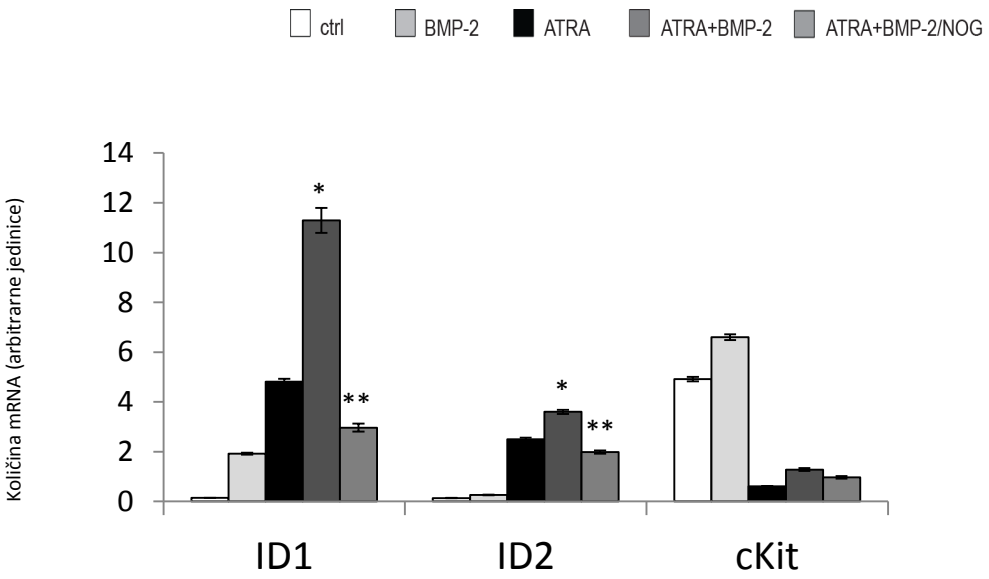


Slika 24. Učinak kombinirane obrade ATRA-om, molekulama BMP-2 i BMP-antagonista NOGGIN mijeloidne leukemijske linije NB4 na izražaj membranskih biljega znakovitih za diferencirane neutrofile. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om u dozi od 0,5 μM, molekulom BMP-2 u dozi od 25 ng/ml i NOGGIN-om u dozi od 100 ng/ml tijekom jednog dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice NB4 koje nisu obrađene ATRA-om, BMP-2 ili NOGGIN-om. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Grafikoni prikazuju postotak stanica koje izražavaju površinski biljeg. Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP-2, prema engl. *bone morphogenetic protein 2*, ctrl, kontrola, NOG, NOGGIN

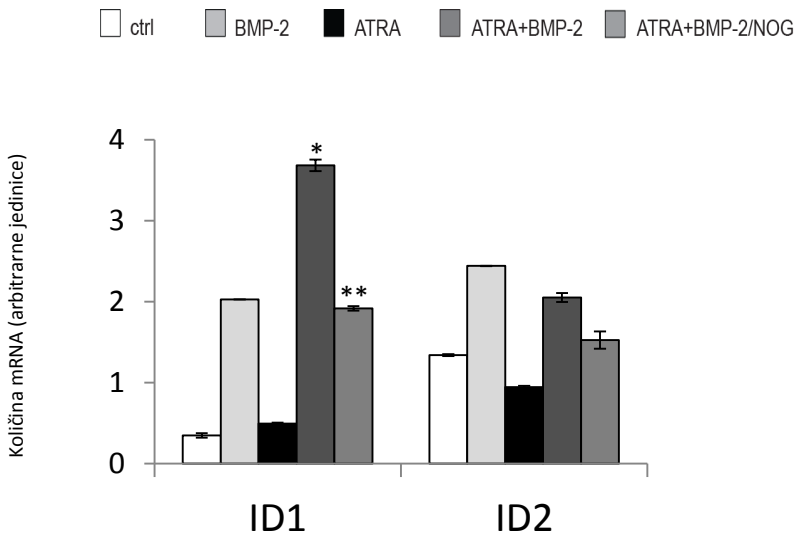


Slika 25. Učinak kombinirane obrade ATRA-om, molekulama BMP-2 i BMP-antagonista NOGGIN mijeloidne leukemijske linije HL60 na izražaj membranskih biljega znakovitih za diferencirane neutrofile. Protočnom citometrijom analiziran je izražaj membranskih biljega CD11b i CD11c nakon obrade ATRA-om u dozi od 2 µM, molekulom BMP-2 u dozi od 25 ng/ml i NOGGIN-om u dozi od 100 ng/ml tijekom dva dana. Za označavanje smo koristili monoklonska protutijela fluorescein-izotiocijanat (FITC)-anti-CD11b i fikoeritrin (PE)-anti-CD11c. Analizirali smo 20000 stanica po uzorku i rezultate prikazali histogramom odnosa intenziteta fluorescencije i broja stanica. Kontrolni uzorak predstavlja stanice HL60 koje nisu obrađene ATRA-om, BMP-2 ili NOGGIN-om. Ograda za određivanje udjela pozitivnih stanica postavljena je prema neoznačenom uzorku i uzorku označenom neimunim protutijelima (izotipska kontrola). Grafikoni prikazuju postotak stanica koje izražavaju površinski biljeg. Prikazan je rezultat reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP-2, prema engl. *bone morphogenetic protein 2*, ctrl, kontrola, NOG, NOGGIN

Protoonkogen cKit sudjeluje u regulaciji proliferacije, diferencijacije i preživljenja normalnih i leukemijskih stanica (186). Za razliku od stanica linije NB4, ovaj gen vrlo je slabo izražen u stanicama linije HL60 (Slike 22 i 23). Na temelju tih rezultata pretpostavljamo da bi jači anti-diferencijacijski učinak molekula BMP koji nalazimo u stanicama NB4 nakon obrade ATRA-om (dvostruko manje $CD11b^+$ stanica; Slika 20) u odnosu na stanice HL60 linije (30% manje $CD11b^+$ stanica; Slika 21) mogao biti posljedica jačeg konstitutivnog izražaja gena za cKit. Nadalje, izražaj gena za cKit u stanicama NB4 višestruko se smanjuje djelovanjem ATRA-e. Obrada samo molekulama BMP-2 ne mijenja značajno izražaj gena za cKit, a zajedničkim djelovanjem ATRA-e i BMP-2 otprilike se dvostruko pojača izražaj tog gena u odnosu na obradu samo ATRA-om (Slika 26).



Slika 26. Izražaj gena koji su transkripcijski regulirani molekulama BMP (ID1, ID2 i cKit) nakon kombinirane obrade mijeloidne leukemijske linije NB4 molekulama BMP-2, ATRA-e i NOGGIN-a. RNA je izolirana iz uzoraka linije NB4 nakon 24 sata kombinirane obrade ATRA-om, BMP-2 i NOGGIN-om i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om, BMP-2 ili NOGGIN-om. Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). Rezultati su prikazani u triplikatu kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i analizirani pomoću statističkog Student-Newman-Keuls *posthoc* testa za analizu varijanci; p vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajne. *, označava statistički značajnu razliku u usporedbi sa tretmanom BMP-2 ili ATRA-om pojedinačno; **, označava statistički značajnu razliku u usporedbi sa kombiniranim tretmanom ATRA/BMP-2. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP-2, prema engl. *bone morphogenetic protein 2*, ctrl, kontrola, NOG, NOGGIN, ID, prema engl. *inhibitor of DNA binding*, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*



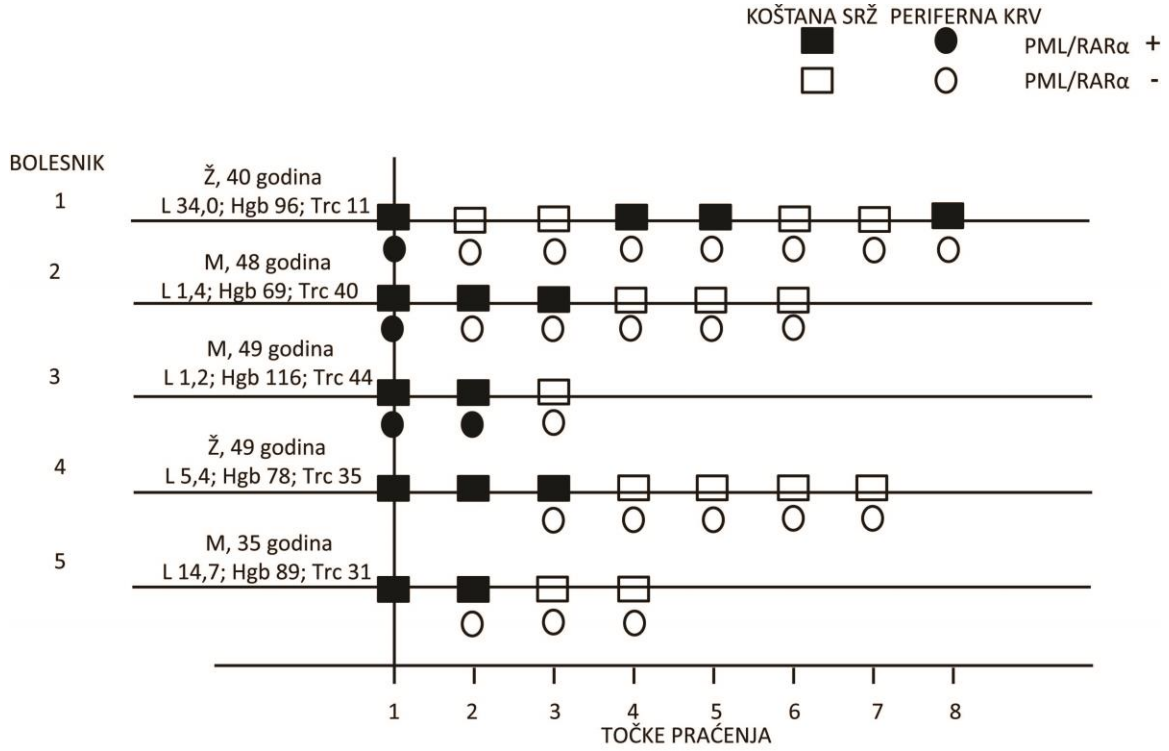
Slika 27. Izražaj gena koji su transkripcijski regulirani molekulama BMP (ID1, ID2) nakon kombinirane obrade mijeloidne leukemijske linije HL60 molekulama BMP-2, ATRA-e i NOGGIN-a. RNA je izolirana iz uzoraka linije HL60 nakon 48 sati kombinirane obrade ATRA-om, BMP-2 i NOGGIN-om i analizirana pomoću kvantitativnog PCR. Kontrolni uzorak predstavlja stanice koje nisu obrađene ATRA-om, BMP-2 ili NOGGIN-om. Vrijednosti izražaja RNA su dobivene uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu mRNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). Rezultati su prikazani u triplikatu kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i analizirani pomoću statističkog Student-Newman-Keuls *posthoc* testa za analizu varijanci; p vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajne. *, označava statistički značajnu razliku u usporedbi sa tretmanom BMP-2 ili ATRA-om pojedinačno; **, označava statistički značajnu razliku u usporedbi sa kombiniranim tretmanom ATRA/BMP-2. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. ATRA, prema engl. *all-trans retinoic acid*, BMP-2, prema engl. *bone morphogenetic protein 2*, ctrl, kontrola, NOG, NOGGIN, ID, prema engl. *inhibitor of DNA binding*, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*

5.4. Značajke bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije i izražaj molekularnog biljega PML/RARα

U uvjetima *in vitro* smo utvrdili važnost molekula BMP u inhibiciji diferencijacije potaknute ATRA-om u mijeloidnim leukemijskim linijama NB4 i HL60. Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je potvrditi rezultate dobivene u uvjetima *in vitro* na primarnim uzorcima bolesnika oboljelih od APL. U tu svrhu analizirali smo izražaj istih molekula čiji smo značaj u patogenezi APL utvrdili na staničnim linijama: onkogena PML/RARα, receptora RARα, molekula BMP-2, -4, -6, BMP-antagonista NOGGIN i BAMBI, te diferencijacijskih i proliferacijskih gena (ID1, ID2, cKit, PU.1, UBE2D3, C/EBPε).

Kako bismo potvrdili ulogu molekula BMP u patogenezi APL, analizirali smo uzorke koštane srži i periferne krvi pet bolesnika u kojih je prema kliničkom protokolu dijagnosticirana APL. Uzorci koštane srži i periferne krvi uzimani su u vrijeme postavljanja dijagnoze te tijekom liječenja i praćenja bolesti, u okviru redovitih kliničkih pregleda u razmacima od 1-3 mjeseca ovisno o tijeku bolesti (Slika 28). U dijagnostičkom uzorku, prije početka liječenja, u koštanoj srži bolesnika dokazano je više od 80% malignih promijelocita. Citogenetska analiza potvrdila je nazočnost onkogena PML/RARα u stanicama koštane srži i periferene krvi bolesnika. U svih bolesnika započeto je liječenje prema modificiranom *AIDA*-protokolu, indukcijskom shemom terapije koja uključuje idarubicin i ATRA-u. Svi ispitivani bolesnici postigli su hematološku remisiju bolesti unutar jednog mjeseca, uz nalaz manje od 5% blasta i manje od 8% promijelocita u koštanoj srži, bez prisutnosti morfološki abnormalnih promijelocita, te uz nalaz manje od 10^9 neutrofila i manje od 10^{11} trombocita u perifernoj krvi. Nakon indukcijske, bolesnici su liječeni konsolidacijskom terapijskom shemom koja uključuje u prvom ciklusu ATRA-u i idarubicin, u drugom ciklusu ATRA-u i mitoksantron te u trećem ciklusu ATRA-u i idarubicin.

Za molekularnu potvrdu bolesti, u dostupnim uzorcima koštane srži i periferne krvi dodatno smo kvantitativno mjerili izražaj fuzijskog onkogena PML/RARα i izražaj ukupnog receptora RARα (Slike 29B i 30B). U bolesnika #2 do #5, nakon primjene indukcijske i konsolidacijske terapije, uz hematološku postignuta je i molekularna remisija bolesti. U uzorcima koštane srži i periferne krvi u fazi molekularne remisije postupkom qPCR nije detektiran izražaj onkogena PML/RARα, uz statistički značajno recipročno pojačanje izražaja ukupnog RARα (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=-0,430, 95% CI -0,692 do -0,068, p=0,025). Nasuprot tome, u bolesnika #1 je, nakon početne remisije, izražaj onkogena PML/RARα ponovno detektiran u koštanoj srži, pa je taj bolesnik preminuo od posljedica relapsa i komplikacija bolesti.



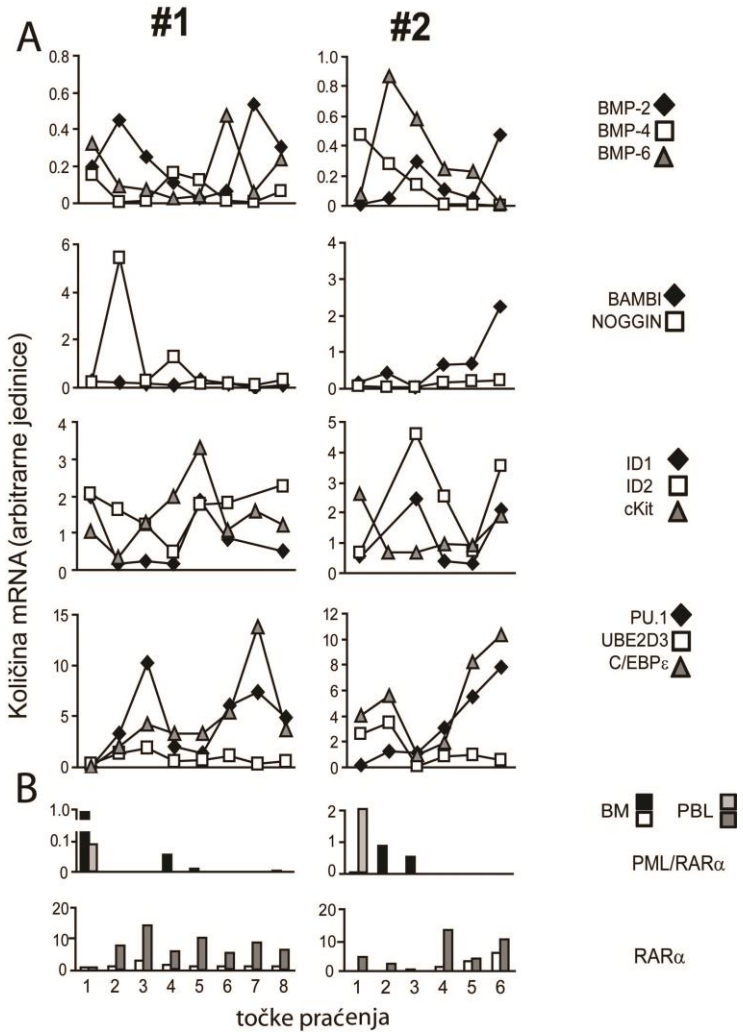
Slika 28. Izražaj onkogena PML/RARα u koštanoj srži i perifernoj krvi bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije. Uzorci koštane srži i periferne krvi uzeti su za vrijeme postavljanja dijagnoze bolesti te u nekoliko točaka praćenja, u razmacima 1-3 mjeseca ovisno o napredovanju bolesti. Za svakog bolesnika prikazani su spol (M, *muško*; Ž, *žensko*), dob, vrijednosti leukocita (L, $\times 10^9$), hemoglobina (Hgb, g/L) i trombocita (Trc, $\times 10^9$/L) za perifernu krv, te nazočnost onkogena. PML/RARα (prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*)

5.5. Obrazac i korelacija izražaja molekula BMP, diferencijacijskih i proliferacijskih gena u odnosu na izražaj molekularnog biljega bolesti u koštanoj srži bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije

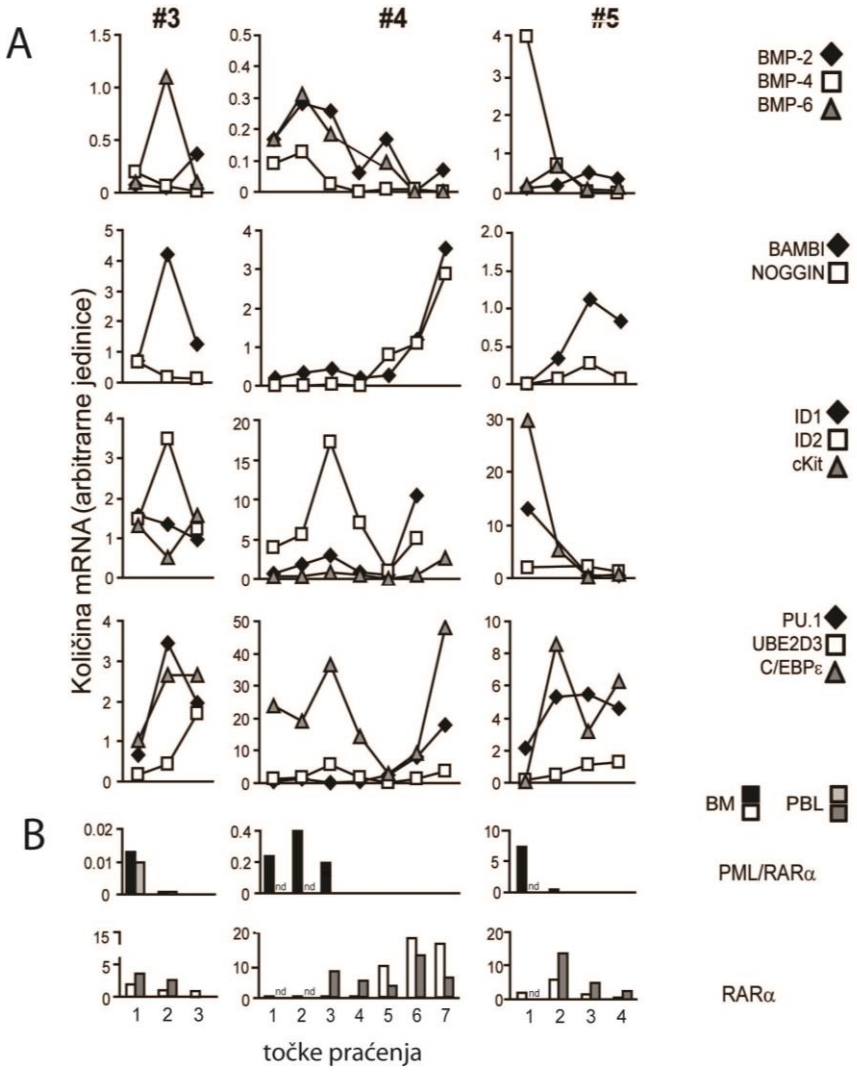
Usporedno s određivanjem izražaja onkogena, u uzorcima koštane srži pratili smo izražaj gena za molekule BMP (BMP-2, BMP-4 i BMP-6), BMP-antagoniste (BAMBI i NOGGIN) te diferencijacijske i proliferacijske gene (ID1, ID2, cKit, PU.1, UBE2D3, C/EBPε) (Slike 29 i 30). Također, molekule BMP djeluju na izražaj nekih od tih gena, primjerice ID1, ID2 i cKit (181, 187). Pojedinačno gledano, izražaj gena znatno varira između bolesnika i između uzoraka istog bolesnika, ali se uočava obrazac smanjenja izražaja gena za molekule BMP, te pojačanje izražaja gena za BMP-antagoniste i diferencijacijske gene s postizanjem remisije bolesti.

Da bi statistički potvrdili taj obrazac izražaja i promjene s postizanjem remisije, korelirali smo vrijednosti izražaja gena za navedene molekule i izražaja onkogena PML/RARα odnosno ukupnog RARα (Tablica 6). Kao najvažnije nalaze ističemo statistički značajnu pozitivnu korelaciju između izražaja PML/RARα i gena za BMP-4 (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,82, 95% CI 0,65 do 0,91, p<0,001) i BMP-6 (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,51, 95% CI 0,16 do 0,74, p=0,010) te gena za ID1 (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,46, 95% CI 0,06 do 0,73, p=0,029). Statistički značajna negativna korelacija potvrđena je između izražaja PML/RARα i gena za BMP-antagonist BAMBI (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=-0,55, 95% CI -0,77 do -0,23, p=0,004) i transkripcijski faktor PU.1 (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=-0,68, 95% CI -0,84 do -0,41, p<0,001). Nasuprot tome, recipročne korelacije potvrđene su u odnosu na izražaj ukupnog retinoičnog receptora RARα. Ističemo statistički značajnu negativnu korelaciju između izražaja RARα i BMP-6 (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=-0,48, 95% CI -0,72 do -0,12, p=0,015) te pozitivnu između izražaja RARα i BMP-antagonista BAMBI

(Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,69, 95% CI 0,42 do 0,84, p<0,001) i transkripcijskog faktora PU.1 (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,68, 95% CI 0,42 do 0,84, p<0,001). Također, izražaj gena za cKit negativno korelira s izražajem onkogena PML/RARα (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=-0,49, 95% CI -0,73 do -0,15, p=0,011), a pozitivno s izražajem ukupnog RARα (Spearmanov koeficijent korelacije ρ=0,43, 95% CI 0,07 do 0,69, p=0,025). Navedeni rezultati obrasca izražaja gena i statistički značajne korelacije potvrđuju naše nalaze na mijeloidnim leukemijskim linijama *in vitro* o anti-diferencijacijskom učinku molekula BMP na stanice promijelocitne leukemije (Slika 26).



Slika 29. Izražaj gena za molekule BMP i srodne molekule, te diferencijacijske i proliferacijske gene u odnosu na izražaj onkogena PML/RARα u bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije. U uzorcima koštane srži kvantitativno je određen izražaj molekula BMP (BMP-2, BMP-4, BMP-6), BMP-antagonista (BAMBI i NOGGIN), diferencijacijskih i proliferacijskih gena (ID1, ID2, cKit, PU.1, UBE2D3, C/EBPε) (A) u odnosu na izražaj onkogena PML/RARα i ukupnog retinoičnog receptora RARα u koštanoj srži i perifernoj krvi (B) za iste točke praćenja bolesti. Dijagnoza je postavljena na temelju kriterija FAB-klasifikacije za AML-M3. Uzorci koštane srži (BM, prema engl. *bone marrow*) i periferne krvi (PB, prema engl. *peripheral blood*) uzeti su za vrijeme postavljanja dijagnoze bolesti te u nekoliko točaka praćenja, u razmacima od 1-3 mjeseca ovisno o napredovanju bolesti, tijekom liječenja indukcijskom i konsolidacijskom terapijom. Uzorci su analizirani pomoću postupka qPCR, a relativna količina RNA određena je uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu RNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, BAMBI, prema engl. *bone morphogenetic and activin membrane-bound inhibitor*, ID prema engl. *inhibitors of DNA binding*, PU.1 transkripcijski faktor, UBE2D3, prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme* 2D3, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*, PML/RARα, prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*, RARα prema engl. *retinoic acid receptor α*



Slika 30. Izražaj gena za molekule BMP i srodne molekule, te diferencijacijske i proliferacijske gene u odnosu na izražaj onkogena PML/RARα u bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije. U uzorcima koštane srži kvantitativno je određen izražaj molekula BMP (BMP-2, BMP-4, BMP-6), BMP-antagonista (BAMBI i NOGGIN), diferencijacijskih i proliferacijskih gena (ID1, ID2, cKit, PU.1, UBE2D3, C/EBPε) (A) u odnosu na izražaj onkogena PML/RARα i ukupnog retinoičnog receptora RARα u koštanoj srži i perifernoj krvi (B) za iste točke praćenja bolesti. Dijagnoza je postavljena na temelju kriterija FAB-klasifikacije za AML-M3. Uzorci koštane srži (BM, prema engl. *bone marrow*) i periferne krvi (PB, prema engl. *peripheral blood*) uzeti su za vrijeme postavljanja dijagnoze bolesti te u nekoliko točaka praćenja, u razmacima od 1-3 mjeseca ovisno o napredovanju bolesti, tijekom liječenja indukcijskom i konsolidacijskom terapijom. Uzorci su analizirani pomoću postupka qPCR, a relativna količina RNA određena je uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju i normalizirane u odnosu na količinu RNA za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) („endogena" kontrola). BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, BAMBI, prema engl. *bone morphogenetic and activin membrane-bound inhibitor*, ID prema engl. *inhibitors of DNA binding*, PU.1 transkripcijski faktor, UBE2D3, prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme* 2D3, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*, PML/RARα, prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*, RARα prema engl. *retinoic acid receptor α*

Tablica 6. Korelacije izražaja gena za molekule BMP i srodne moelekule, te diferencijacijske i proliferacijske gene u odnosu na izražaj onkogena PML/RARα i ukupnog RARα u bolesnika koji boluju od akutne promijelocitne leukemije

PML/RARα vs*	Spearman rho (95% CI), p**	RARα vs	Spearman rho (95% CI), p
BMP-2	-0,17 (-0,51 to 0,22), p=0,385	BMP-2	0,01 (-0,36 to 0,38), p=0,952
BMP-4	0,82 (0,65 to 0,91), **p<0,001**	BMP-4	-0,22 (-0,55 to 0,17), p=0,252
BMP-6	0,51 (0,16 to 0,74), **p=0,010**	BMP-6	-0,48 (-0,72 to -0,12), **p=0,015**
ID1	0,46 (0,06 to 0,73), **p=0,029**	ID1	-0,10 (-0,48 to 0,32), p=0,642
ID2	0,29 (-0,13 to 0,62), p=0,160	ID2	-0,34 (-0,65 to 0,08), p=0,106
cKit	-0,49 (-0,73 to -0,15), **p=0,011**	cKit	0,43 (0,07 to 0,69), **p=0,025**
BAMBI	-0,55 (-0,77 to -0,23), **p=0,004**	BAMBI	0,69 (0,42 to 0,84), **p<0,001**
NOGGIN	0,16 (0,22 to 0,51), p=0,398	NOGGIN	0,07 (-0,31 to 0,43), p=0,716
PU.1	-0,68 (-0,84 to -0,41), **p<0,001**	PU.1	0,68 (0,42 to 0,84), **p<0,001**
UBE2D3	-0,14 (-0,49 to 0,25), p=0,474	UBE2D3	-0,33 (-0,63 to 0,05), p=0,088
C/EBPε	-0,14 (-0,48 to 0,25), p=0,481	C/EBPε	0,01 (-0,37 to 0,38), p=0,975

*Uzorci su analizirani pomoću uparene qPCR. PML/RARα, prema engl. *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor α*, BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*, ID, prema engl. *inhibitors of DNA binding*, cKit, prema engl. *tyrosine-protein kinase*, BAMBI, prema engl. *bone morphogenetic and activin membrane-bound inhibitor*, PU.1, transkripcijski faktor, UBE2D3, prema engl. *ubiquitin-conjugating enzyme* 2D3, RARα, prema engl. *retinoic acid receptor α*, vs, prema. lat. *versus*

**Korelacije između izražaja pojedinih gena u primarnim uzorcima statistički su analizirane testom korelacije ranga i Spearmanovim koeficijentom rho (ρ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti (vrijednost α) uzeli smo vrijednost 0,05. Masno su otisnute statistički značajne korelacije (p<0,05).

6. RASPRAVA

6.1. ATRA potiče diferencijaciju stanica akutne promijelocitne leukemije

APL u odnosu na sve zloćudne bolesti krvotvornog tkiva javlja se razmjerno rijetko. U Republici Hrvatskoj godišnje se pojavljuje oko 2-3 slučaja novooboljelih s predilekcijom prema pojedinim dobnim skupinama. Gotovo ju ne nalazimo u djece mlađe od 10 godina, a učestalost raste tijekom puberteta sa vrhuncem incidencije u ranoj odrasloj dobi. U osoba starijih od 60 godina smanjuje se pojavnost ove bolesti (188). U pojedinim istraživanjima navodi se nešto učestalija pojava APL u određenim etničkim skupinama. Tako od ove bolesti češće obolijevaju osobe iz Meksika, Centralne i Južne Amerike, Italije i Španjolske u odnosu na ukupnu populaciju (189, 190). Pojedini podaci iz literature kao rizični čimbenik za nastanak ove bolesti navode izloženost određenim citostaticima. Poglavito se to odnosi na lijekove koji djeluju na topoizomerazu II, primjerice epirubicin i mitoksantron (191-193) koji se često rabe u bolesnica oboljelih od karcinoma dojke.

Molekularna značajka APL je nazočnost translokacije t(15;17) u zloćudnom klonu stanica, zbog čega nastaje onkogen odnosno fuzijski protein PML/RARα. Kao posljedica te aberacije nakupljaju se u koštanoj srži maligni promijelociti koji se ne mogu diferencirati u zrele hematopoetske stanice zbog nedostatne funkcije normalnog receptora RARα koji omogućuje pokretanje signalnog puta RA nužnog za normalnu diferencijaciju stanica (194). Uvođenjem diferencijacijske terapije ATRA-om potiče se diferencijacija zloćudno promijenjenih promijelocita u zrele granulocite. Kombinacija ATRA-e sa citostaticima prema nekim multicentričnim istraživanjima, dovodi do stope izlječenja bolesti od čak 70% (195). Stopa

izlječenja ovisi i o suportivnoj terapiji, koja se daje ovakvim bolesnicima zbog ranog nastanka krvarenja kao posljedice koagulopatije te deficijencije pojedinih krvnih stanica i infekcija, kao i o ranoj dijagnozi ove bolesti (195).

Iako učinkovita, tijekom terapije ATRA-om mogu se razviti ozbiljne nuspojave, primjerice APL-diferencijacijski sindrom karakteriziran vrućicom, respiratornim distresom, perikardijalnim i pleuralnim izljevom te bubrežnim zatajenjem (196). Osim toga, čak 20% do 30% bolesnika razvija rezistenciju na standardne protokole liječenja (64, 197). Upravo iz tih razloga javlja se potreba za istraživanjem patogenetskih čimbenika koji bi sugerirali komplementarne terapijske pristupe i omogućili trajno izlječenje te što rjeđu pojavu nuspojava i recidiva.

Osim najučestalije translokacije t(15;17), u bolesnika oboljelih od APL dokazane su i druge genetske aberacije, primjerice translokacije t(11;17), t(5;17) i t(17;17), ali samo u oko 5% bolesnika (174). Takva razlika u genotipu zloćudnog klona, govori u prilog činjenici da su i stanice koje nose druge genetske alteracije osim t(15;17) osjetljive na diferencijacijski učinak ATRA-e (174).

U našem smo istraživanju kombinirani učinak ATRA-e i molekula BMP *in vitro* ispitali na dvije mijeloidne leukemijske linije NB4 i HL60. NB4 je stanična linija dobivena iz bolesnika koji je bolovao od APL, nosi translokaciju t(15;17) i osjetljiva je na djelovanje retinoične kiseline, dok je HL60 stanična linija mijeloblastične leukemije koja je također osjetljiva na djelovanje retinoične kiseline, ali zloćudni klon nema translokaciju t(15;17). Sama nazočnost translokacije nije nužna za učinak molekula BMP, jer smo u obje stanične linije potvrdili kočenje diferencijacije potaknute ATRA-om dodatkom molekula BMP, premda je taj anti-diferencijacijski učinak BMP-a bio izraženiji u stanicama NB4. Temelj liječenja APL je

diferencijacijska terapija koja uključuje primjenu ATRA-e ili arsen-trioksida. ATRA nema izravni citotoksični učinak na zloćudne promijelocite bolesnika koji boluju od APL, nego potiče njihovu terminalnu diferencijaciju u granulocite koji onda spontano odumiru procesom apoptoze. ATRA uzrokuje degradaciju fuzijskog onkogena PML/RARα (198), odnosno povećava izražaj normalnog funkcionalnog RARα koji je ujedno i nuklearni receptor za retinoičnu kiselinu, potrebnu za diferencijaciju mijeloidne loze. U staničnim linijama NB4 i HL60 ATRA potiče diferencijaciju iz zloćudnih promijelocita u neutrofile. U našim pokusima pokazali smo da je obrada ATRA-om pojačala izražaj gena za PML/RARα kao i za RARα što potiče mijeloidnu diferencijaciju (38, 199). U stanicama HL60 također smo djelovanjem ATRA-e uočili pojačanje izražaja gena za RARα. Upravo je djelovanje retinoične kiseline putem receptora RARα odgovorno za terminalnu diferencijaciju stanica HL60 (200). Djelovanje arsen-trioksida na promijelocitne stanice bolesnika koji boluju od APL ovisno je o dozi. U visokim koncentracijama arsen-trioksid uzrokuje apoptozu, a u nižim potiče diferencijaciju promijelocita (201, 202). Kombinirano liječenje arsen-trioksidom i ATRA-om jednako je učinkovito, ako ne i učinkovitije nego liječenje ATRA-om i citostaticima i može se primjenjivati u bolesnika u kojih je kontraindicirana citostatska terapija (203).

U našem istraživanju smo, osim diferencijacijskog učinka ATRA-e, pratili i učinak ATRA-e na apoptozu i stanični ciklus linija NB4 i HL60. Apoptoza je proces samoprogramirane smrti stanice, u kojem dolazi do kondenzacije jezgre, smanjivanja stanice, pucanja membrane i degradacije stanične jezgre (182). Zanimljivo je da su se analizirane stanične linije razlikovale prema udjelu apoptotičnih i nekrotičnih stanica nakon obrade ATRA-om. Djelovanjem ATRA-e *in vitro* smanjio se udio apoptotičnih i nekrotičnih stanica NB4, a u isto vrijeme, povećao se udio stanica u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa. Pretpostavljamo da je došlo do nakupljanja diferenciranih

stanica, što može biti relevantno za objašnjenje nastanka APL-diferencijacijskog sindroma, koji se viđa u bolesnika liječenih ATRA-om (204). Sindrom se javlja u oko četvrtine bolesnika na indukcijskoj terapiji ATRA-om, a karakteriziran je nakupljanjem zrelih granulocita i može dovesti do smrtnoga ishoda u takvih bolesnika. Klinička slika sindroma obuhvaća vrućicu, akutni porast tjelesne težine veći od 5 kg, periferne edeme, dispneju, nastanak plućnih infiltrata, pleuroperikardijalni izljev, hipotenziju i akutno bubrežno zatajenje (204).

Za razliku od stanica NB4, diferencijacijom stanica HL60 od mijeloblasta u neutrofile djelovanjem ATRA-e povećava se udio apoptotičnih/mrtvih stanica, također uz nakupljanje stanica u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa, što se može objasniti smanjenjem izražaja onkogena Bcl-2 u stanicama obrađenim ATRA-om (205, 206, 207).

Pokazano je da je učinak retinoične kiseline na diferencijaciju jači ako se stanice nalaze na granici G1/S faze staničnog ciklusa nego u drugim fazama staničnog ciklusa (208), (209). Povećanje udjela stanica u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa vjerojatno je uzrokovano pojačanim izražajem gena ID1 i ID2 potaknutih ATRA-om (210).

6.2. Djelovanje molekula BMP na hematopoetske stanice

Molekule BMP imaju važnu ulogu u sazrijevanju hematopoetskih stanica na koje djeluju putem autokrinog/parakrinog mehanizma. Pojedine molekule BMP specifično djeluju na neke loze hematopoetskih stanica. Tako primjerice BMP-4 djeluje na limfocite T, a BMP-7 na normalne cirkulirajuće limfocite T i B te stanice humane B-limfoidne linije *Ramos* (147). Također, pojačan izražaj molekula BMP-4 i BMP-7 dokazan je u nekim hematološkim zloćudnim bolestima (147), dok je poremećaj u BMP-signalnom putu utvrđen u nekim ne-hematološkim zloćudnim bolestima, primjerice karcinomu pankreasa, bilijarnoga trakta i debeloga crijeva (211-213). S druge strane molekule BMP mogu inhibirati rast zloćudnih stanica jer potiču apoptozu u nekim staničnim linijama, primjerice ljudskim mijelomskim linijama i u primarnim uzorcima bolesnika koji boluju od multiplog mijeloma (148, 214). U prethodnim istraživanjima smo pokazali da i stanice APL izražavaju gene za neke molekule BMP, primjerice stanice NB4 izražavaju gen za BMP-2, a stanice HL60 gen za BMP-4, koji djeluju putem istog receptorskog kompleksa. Također, obje stanične linije izražavaju BMP-receptore, poglavito BMPRIA, BMPRII i ActRIIB, što bi upućivalo i na autokrini i na parakrini učinak molekula BMP (215). Molekule BMP i njihovi receptori dokazani su i u koštanoj srži bolesnika s drugim hematološkim bolestima, primjerice multiplom mijelomu, akutnoj limfocitnoj leukemiji i mijeloproliferativnom poremećaju (153, 170, 214). Neke studije upućuju na zaključak o funkcionalnoj interakciji djelovanja ATRA-e i molekula BMP, pa je tako poznato da su ATRA i BMP-2 nužni za izazivanje apoptoze stanica meduloblastoma (216), dok ATRA i BMP-6 mogu potaknuti diferencijaciju stanica neuroblastoma (217).

6.3. Koštani morfogenetski proteini koče diferencijaciju stanica akutne promijelocitne leukemije potaknutu ATRA-om

Uloga gena i proteina ID

Cilj naše studije bio je istražiti mehanizme kojima molekule BMP sprječavaju diferencijaciju stanica APL potaknutu ATRA-om. U dosadašnjim istraživanjima dokazan je pojačan izražaj gena ID u stanicama linije NB4 i u bolesnika koji boluju od APL nakon obrade ATRA-om (210). Isto tako molekule BMP potiču izražaj proteina ID (218). Na temelju tih istraživanja i vlastitih rezultata, zaključili smo da bi geni, odnosno proteini ID, mogli predstavljati molekularnu poveznicu i posredovati učinak molekula BMP na kočenje diferencijacije stanica APL. Proteini ID reguliraju brojne fiziološke i patološke stanične procese, primjerice sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa interakcijom s proteinom retinoblastoma (219), angiogenezi, nastanku metastaza i tumorigenezi (220, 221). Geni ID izraženi su u različitim mijeloidnim stanicama, granulocitima i makrofagima, a potaknuti su tijekom neutrofilne diferencijacije (183, 222, 223). Inhibicija rasta stanica NB4 posredovana je genima ID1 i ID2, jer ti geni povećavaju udio stanica u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa neovisno o učinku na diferencijaciju i apoptozu stanica NB4 (210). Također, fuzijski protein PML/RARα, kojeg nalazimo u 5-10% stanica mijeloidnih leukemija, odgovoran je za aktivaciju promotera gena ID1 i ID2 (224). Ektopični izražaj gena ID1 u $CD34^+$ stanicama inhibira razvoj eozinofila, uz pojačanu diferencijaciju neutrofila. Također, pojačan izražaj gena ID2 ubrzava sazrijevanje mijeloidnih stanica (225). Osim funkcionalne poveznice s nazočnošću onkoproteina PML/RARα, geni ID su ciljni geni BMP/SMAD-signalnog puta u embrionalnim matičnim stanicama (226), a BMP-4 potiče izražaj gena ID (181). Pojačan BMP-signal potiče izražaj gena ID1, ID2 i ID3 u stanicama unutarnjeg uha, dok BMP-antagonist NOGGIN i inhibitor BMP-receptora *dorsomorphin* imaju suprotan

učinak (227). U istraživanjima Clementa i sur. pokazano je da se obradom stanica karcinoma dojke molekulama BMP-2 pojačava izražaj gena ID1, ID2 i ID3 (228). BMP-2 pojačava izražaj gena ID i u stanicama osteoblastičnih linija (229). U stanicama karcinoma pluća taj učinak ostvaruje se aktivacijom signalnih molekula SMAD1/5 (230). U našem istraživanju dodavanjem BMP-antagonista NOGGIN u kulturu stanica NB4 i HL60 obrađenih ATRA-om i molekulom BMP-2, smanjuje se izražaj gena ID1 i ID2. To je u skladu s prijašnjim istraživanjem u kojem je utvrđena inhibicija fosforilacije signalnog puta SMAD 1/5/8 i izražaja ID-proteina nakon istodobne obrade molekulom BMP-2 i NOGGIN-om (231). Nadalje, aktivacija BMP/SMAD-signala potiče izražaj gena ID u neuroepitelnim stanicama (232). U primarnim uzorcima koštane srži bolesnika oboljelih od APL koje smo analizrali u našem istraživanju potvrdili smo pozitivnu korelaciju između izražaja onkogena PML/RARα i izražaja gena za BMP-4, BMP-6 i ID1. Navedeni rezultati dobiveni na staničnim linijama i primarnim uzorcima bolesnika oboljelih od APL dokazuju da je regulacija izražaja gena i proteina ID molekulama BMP važna za posredovanje njihova učinka na različite vrste stanica.

Djelovanje ATRA-e i molekula BMP na diferencijacijske i proliferacijske gene hematopoetskih stanica

Molekule BMP važne su za regulaciju diferencijacije hematopoetskih stanica održavajući homeostazu u koštanoj srži, kao i diferencijaciju nekih leukemijskih stanica (145, 148, 187, 233). Na temelju spoznaja proizašlih iz tih istraživanja, pretpostavili smo da molekula BMP djeluju na gene koji reguliraju granulocitnu diferencijaciju i na taj način koče diferencijaciju stanica promijelocitne leukemije u granulocite nakon obrade ATRA-om. Da bi identificirali gene koji bi

mogli biti ključni za anti-diferencijacijski učinak molekula BMP, grupirali smo ih u skupinu diferencijacijskih gena (Asb2, PU.1, UBE2D3, C/EBPε), čiji se izražaj obradom ATRA-om pojačava (234-237), i u skupinu proliferacijskih gena (C/EBPα, Dlx4, cKit i Bcl2), čiji se izražaj obradom ATRA-om smanjuje (238-240). Pri odabiru tih gena, posebice smo se fokusirali na one na čiji izražaj djeluju molekule BMP (241-243). Gen Asb2 smatramo važnim ciljnim genom za djelovanje ATRA-e, a razinu izražaja pokazateljem učinkovitosti djelovanja ATRA-e. Izražaj gena Asb2 povećan je tijekom diferencijacije stanica HL60 (234), ali i stanica NB4, što smo dokazali u našem istraživanju. Transkripcijski čimbenik PU.1 izražen je u granulocitima i važan je za mijeloidnu diferencijaciju (244-246), a suprimiran je u stanicama promijelocitne leukemije (247). Naši su rezultati potvrdili pojačan izražaj gena za PU.1 nakon obrade leukemijskih stanica ATRA-om, te smanjenje izražaja nakon što su uzorcima obrađenima ATRA-om dodane i molekule BMP. I transkripcijski čimbenik PU.1 i molekule BMP imaju učinak na transkripciju gena ID2, a interakcija transkripcijskog čimbenika PU.1 i signalne molekule SMAD-1 pospješuje izražaj interleukina 1β u stanicama makrofaga izloženih djelovanju BMP-6 (241). Povećan izražaj gena za transkripcijski čimbenik PU.1 u stanicama eritroidne loze uzrokuje razvoj eritroleukemije (248), dok smanjenje izražaja divljeg tipa potiče nastanak mijeloidne leukemije u miša (249). U stanicama koje sadrže onkoprotein PML/RARα smanjen je izražaj transkripcijskog čimbenika PU.1, dok ATRA-a pojačava njegov izražaja i time potiče granulocitnu diferencijaciju (235). Izražaj transkripcijskog čimbenika PU.1 je u negativnoj korelaciji s izražajem onkogena PML/RARα u primarnim uzorcima bolesnika koji boluju od APL (235), što smo potvrdili i u našem istraživanju. Povećanju izražaja transkripcijskog čimbenika PU.1 nakon djelovanja ATRA-e potpomaže i pojačan izražaj transkripcijskih čimbenika C/EBP koji su nužni za terminalnu granulocitnu diferencijaciju (250). C/EBPε je

ciljni gen na koji djeluje ATRA te posreduje diferencijaciju leukemijskih stanica (251). U našem modelu, izražaj tog transkripcijskog čimbenika pojačan je u stanicama NB4 i HL60 obrađenim ATRA-om. Ektopični izražaj C/EBPα u ljudskim $CD34^+$ stanicama potiče granulocitnu, a koči eritroidnu diferencijaciju te snažno potiče izražaj gena za ID1 (252). Mutacija gena C/EBPα sprječava diferencijaciju u granulocite, dok pojačan izražaj potiče granulocitnu diferencijaciju stanica mijeloidne leukemije (253, 254).

Obrazac izražaja analiziranih gena upućuje na zaključak da obrada molekulama BMP koči izražaj gena za transkripcijske čimbenike PU.1 i C/EBPε, potaknut ATRA-om. Pretpostavili smo da bi to kočenje diferencijacije molekulama BMP, unatoč diferencijacijskom djelovanju ATRA-e, moglo biti relevantno za razumijevanje mehanizama razvoja rezistencije na djelovanje ATRA-e u bolesnika koji boluju od APL. Transkripcijski čimbenik PU.1 važan je u procesu granulocitne diferencijacije (255), a transkripcijski čimbenici C/EBP aktiviraju promotor gena za PU.1 djelovanjem ATRA-e (235). Mikrookoliš koštane srži bogat molekulama BMP mogao bi kočiti diferencijaciju leukemijskih stanica smanjivanjem izražaja gena za te transkripcijske čimbenike. Također, transkripcijski čimbenici C/EBP u interakciji su sa signalnim molekulama SMAD te stvaraju C/EBP-SMAD-molekularne komplekse. Mehanizam funkcionalnog antagonizma djelovanja molekula C/EBP i SMAD mogao bi se objasniti djelovanjem molekula SMAD na koaktivator transkripcijskih čimbenika C/EBP ili kompeticijom molekula C/EBP i SMAD za isti koaktivator (256). Dokazano je da molekula SMAD-4 interferira s djelovanjem transkripcijskog čimbenika C/EBPβ sprječavajući njegovo vezanje na DNA (257).

Nasuprot genima čiji se izražaj pojačava granulocitnom diferencijacijom, analizirali smo i neke gene čiji je se izražaj povezan sa zloćudnim proliferacijskim potencijalom, a smanjuje se diferencijacijom stanica potaknutom ATRA-om, uključujući Bcl-2 i Dlx4 (238, 258). Pojačana

količina proteina Bcl-2 predstavlja loš prognostički znak u bolesnika kojima je u leukemijskim stanicama dokazana translokacija t(15;17) (259). Smanjen izražaj Bcl-2 olakšava indukciju apoptoze, a uočen je u stanicama NB4 koje se diferenciraju djelovanjem ATRA-e (260), što smo potvrdili i u našem istraživanju na stanicama NB4 i HL60. Dlx4, *homeobox* gene, povezan je s proliferacijom i tumorigenezom (238). Dvije izoforme toga gena, Dlx7 i Dlx4, su pojačano izražene u bolesnika koji boluju od AML, dok se izražaj smanjuje kombiniranom obradom ATRA-om i citostaticima (238, 258). Premda naši rezultati pokazuju da pokretanje BMP-signalnog puta koči diferencijaciju promijelocita, nismo uočili djelovanje molekula BMP na izražaj navedenih proliferacijskih gena. S druge strane, obrada molekulama BMP djeluje na gene uključene u regulaciju staničnog ciklusa. ATRA potiče izražaj enzima koji omogućuje degradaciju ciklina D1 UBE2D3, koji tako posreduje zastoj rasta stanica (236), a naši rezultati pokazuju da se taj poticajan učinak ATRA-e smanjuje dodavanjem molekula BMP. Iz tih rezultata zaključili smo da bi rezultat učinka molekula BMP, smanjivanjem izražaja gena za UBE2D3, moglo biti povećanje udjela stanica u aktivnim fazama staničnog ciklusa.

6.4. Međudjelovanje signalnih puteva ATRA-e i molekula BMP

Molekule nadobitelji TGF-β, kojoj pripadaju i molekule BMP, mogu inhibirati proliferaciju različitih vrsta stanica (261). Nakon vezanja molekula TGF-β na serin/treoninske-receptore tipa I i II fosforiliraju se proteini SMAD. Na temelju istraživanja La i sur., koji su pokazali da receptor RARα, interakcijom sa signalnom molekulom SMAD-3, ometa inhibiciju rasta epitelnih stanica potaknutu čimbenikom TGF-β (262), pretpostavili smo da istodobna obrada ATRA-om i molekulama BMP uzrokuje interferenciju učinaka ta dva signalna puta i na taj način potiče održavanje nezrelog fenotipa stanica promijelocitne leukemije. BMP-signal tijekom obrade ATRA-om pridonosi indukciji gena ID, što može kočiti diferencijaciju stanica, s obzirom da su geni ID, osim poznate uloge u regulaciji diferencijacije granulocita, važni i u regulaciji proliferacije i maligne transformacije hematopoetskih, poglavito mijeloidnih stanica (263).

Osim interferencijom signalnih puteva, molekule BMP bi mogle kočiti diferencijaciju potaknutu ATRA-om i djelovanjem na izražaj protoonkogena cKit, koji kodira tirozin-kinazni receptor, a nalazimo ga na brojnim vrstama ljudskih stanica, uključujući i mononuklearne stanice koštane srži te u nekim subtipovima mijeloidne leukemije (264, 265). Izražaj mu je reguliran i signalom retinoične kiseline i molekula BMP, a sudjeluje u regulaciji proliferacije, diferencijacije i preživljenja normalnih hematopoetskih i leukemijskih stanica (266, 267). U našem istraživanju uočili smo negativnu korelaciju izražaja gena za cKit i onkogena PML/RARα, te pozitivnu korelaciju s izražajem ukupnog receptora RARα u uzorcima koštane srži bolesnika oboljelih od APL, što bi upućivalo na ulogu gena za cKit u diferencijaciji stanica promijelocitne leukemije potaknutu ATRA-om, a ne na njegovu funkciju proto-onkogena (268).

6.5. Izražaj onkogena PML/RARα pozitivno korelira s izražajem gena za molekule BMP i ID u bolesnika oboljelih od akutne promijelocitne leukemije

APL je prva zloćudna bolest s visokom stopom izlječivosti u kojoj je molekularna terapija usmjerena na specifičnu genetsku alteraciju. Liječenje bolesnika temelji se na diferencijacijskoj terapiji ATRA-om ili arsen-trioksidom koji potiču degradaciju fuzijskog onkogena PML/RARα. Za potvrdu dijagnoze bolesnicima je potrebno, uz analizu uzoraka periferne krvi, napraviti i biopsiju koštane srži. Dijagnoza se potvrđuje citološkim bojenjem koje prikazuje morfološke biljege stanica postupcima po Romanowskom, Wright-Giemsi ili May-Grunwald Giemsi. Imunofenotipizacijom, upotrebom protočnog citometra, analizira se izražaj membranskih biljega stanica, a fenotipski nalaz $CD34^{-/+}CD117^{+/-}HLADR^{-/+}CD13^{+/++}CD11b^{-}$ znakovit je za promijelocite (269). Genetskom analizom, koja uključuje postupke poput kariotipizacije, fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH), PCR, dokazuje se postojanje onkogena PML/RARα (195). Liječenje ATRA-om i citostaticima potrebno je započeti već kod prve sumnje na APL na temelju kliničkih nalaza i perifernog razmaza krvi, čime se sprječava razvoj po život opasnih komplikacija, primjerice krvarenja (58). Djelovanjem ATRA-e dolazi do molekularne remisije odnosno degradacije onkogena PML/RARα i povećanja izražaja normalnog RARα. Time se potiče diferencijacija promijelocita djelovanjem retinoične kiseline. Molekularna remisija u bolesnika analiziranih u našem istraživanju povezana je sa smanjenim izražajem BMP i ID-gena. Nalaz pozitivne korelacije tih gena s fuzijskim onkogenom PML/RARα i negativne korelacije s ukupnim RARα u koštanoj srži upućuje na njihovu važnost u patogenezi APL. S druge strane, negativna korelacija diferencijacijskih gena PU.1 i UBE2D3 i onkogena PML/RARα potvrđuje njihovu ulogu u diferencijaciji stanica APL potaknutoj ATRA-om. Također, inhibicijski učinak

molekula BMP na izražaj tih diferencijacijskih gena mogao bi objasniti razvoj rezistencije na liječenje ATRA-om u bolesnika koji boluju od APL.

Sheng i sur. su pokazali da retinoična kiselina potiče degradaciju fosforilirane molekule SMAD1 (270) te na taj način koči BMP-signalni put. Međutim, u našim smo istraživanjima *in vitro* uočili da ATRA smanjuje izražaj BMP-antagonista NOGGIN-a i BAMBI te inhibicijske molekule SMAD-6, što bi imalo suprotan učinak. Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da je interakcija signalnih puteva potaknutih ATRA-om i molekulama BMP vrlo složena, te da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnili i drugi molekularni mehanizmi te interakcije.

Bolesnici s relapsom APL, rezistentni na ATRA-u, mogu se liječiti arsen-trioksidom (94, 95, 271, 272) i citostaticima, ali s manjom uspješnošću u odnosu na bolesnike osjetljive na liječenje ATRA-om (273). Stoga je istraživanje novih modaliteta liječenja i uvođenje komplementarne terapije klinički iznimno važno. U našem prethodnom istraživanju pokazali smo pojačan izražaj molekula BMP u bolesnika oboljelih od APL (153), a ovo je istraživanje nadopunilo te rezultate razjašnjenjem anti-diferencijacijskog učinka molekula BMP. Molekule BMP u uvjetima *in vitro* sprječavaju diferencijaciju promijelocita potaknutu ATRA-om poticanjem ID-gena i kočenjem izražaja diferencijacijskih gena, a njihov izražaj povezan je s izražajem fuzijskog onkogena u koštanoj srži bolesnika koji boluju od APL, iz čega smo zaključili da molekule BMP sudjeluju u patogenezi bolesti. Smatramo da naša istraživanja mogu pridonjeti razjašnjenju uloge molekula BMP i BMP-antagonista u bolesnika koji su razvili oblik bolesti rezistentan na djelovanje ATRA-e. Osim toga, anti-diferencijacijski učinak molekula BMP potvrđen je na stanicama HL60, pa bi se inhibicija djelovanja molekula BMP mogla dalje istraživati kao komplementarni način liječenja onih oblika bolesti koje nemaju translokaciju t(15;17), a razmjerno su otporni na standardne protokole liječenja.

7. ZAKLJUČCI

1. Molekule BMP koče diferencijaciju promijelocitnih leukemijskih stanica potaknutu ATRA-om i povećavaju udio nediferenciranih promijelocita u uvjetima *in vitro,* na modelu mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60.

2. ATRA potiče diferencijaciju i zastoj rasta stanica linije NB4, ali u isto vrijeme smanjuje udio apoptotičnih/mrtvih stanica, što može biti relevantno za objašnjenje APL-diferencijacijskog sindroma, karakteriziranog nakupljanjem granulocita, u bolesnika liječenih ATRA-om.

3. BMP-antagonist NOGGIN poništava anti-diferencijacijski učinak molekula BMP na stanice mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 potaknute ATRA-om, potvrđujući da je kočenje diferencijacije specifično posredovano molekulama BMP.

4. Geni ID pojačano su izraženi u stanicama NB4 i uzorcima bolesnika koji boluju od APL, a njihov izražaj dodatno potiču molekule BMP, pa držimo da bi ti geni mogli posredovati anti-diferencijacijski učinak molekula BMP.

5. Nakon obrade stanica ATRA-om pojačava se izražaj diferencijacijskih gena PU.1 i C/EBPε, a taj učinak zakočen je djelovanjem molekula BMP, što bi moglo predstavljati molekularnu osnovu interferencije BMP-signala i diferencijacijskog djelovanja ATRA-e .

6. Izražaj gena za cKit negativno korelira s izražajem onkogena PML/RARα, a pozitivno s izražajem ukupnog RARα u uzorcima koštane srži bolesnika oboljelih od APL, što upućuje

na ulogu gena za cKit u diferencijaciji stanica promijelocitne leukemije potaknutoj ATRA-om, a ne na njegovu funkciju proto-onkogena.

7. Izražaj ukupnog receptora RARα, koji posreduje diferencijacijski učinak retinoične kiseline, negativno korelira s izražajem gena za BMP-6, a pozitivno s izražajem BMP-antagonista BAMBI, što potvrđuje važnost molekula BMP u patogenezi APL.

8. Anti-diferencijacijski učinak molekula BMP potvrđen je na stanicama HL60, što upućuje na zaključak da su molekule BMP važne i u oblicima APL koje nemaju translokaciju t(15;17), a karakterizirani su razmjerno lošijim učinkom standardne diferencijacijske terapije ATRA-om.

8. SAŽETAK

Akutna promijelocitna leukemija (APL) je zloćudna hematološka bolest koju karakterizira translokacija t(15;17). Kao posljedica te translokacije nastaje onkogen PML/RARα. Time je onemogućena diferencijacija zloćudnih promijelocita u zrele granulocite. Liječenje bolesti temelji se na diferencijacijskoj terapiji *all-trans* retinoičnom kiselinom (ATRA) ili arsen-trioksidom. Ti lijekovi potiču terminalnu diferencijaciju promijelocita u granulocite na način da dovode do degradacije i promjene konformacije onkoproteina PML/RARα. Međutim, u velikog broja bolesnika tijekom liječenja ATRA-om razvija se relaps bolesti i rezistencija na liječenje ATRA-om te po život opasne komplikacije.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mehanizam kočenja diferencijacije stanica APL, potaknute ATRA-om, djelovanjem molekula BMP, uporabom mijeloidnih leukemijskih staničnih linija NB4 i HL60. Koristili smo dvije mijeloidne leukemijske linije: NB4, koja ima translokaciju t(15;17) i HL60, koja nema tu translokaciju, kako bi dokazali da učinak molekula BMP nije isključivo ovisan o izražaju onkoproteina PML/RARα. Stanične linije obrađivali smo ATRA-om i molekulama BMP te BMP-antagonistom NOGGIN.

Obradom stanica mijeloidnih leukemijskih linija NB4 i HL60 ATRA-om dolazi do diferencijacije zloćudnih promijelocita u granulocite. Dodavanje molekula BMP u uzorke obrađene ATRA-om značajno se smanjuje udio diferenciranih stanica. Nasuprot tome, dodavanjem i BMP-antagonista NOGGIN poništava se anti-diferencijacijski učinak BMP-a.

Da bi razjasnili mehanizam anti-diferencijacijskog učinka molekula BMP nakon obrade mijeloidnih leukemijskih linija ATRA-om, pratili smo obrazac izražaja gena važnih za

diferencijaciju, proliferaciju, apoptozu, koji u isto vrijeme sudjeluju u signalnim putevima ATRA-e i BMP-a. Rezultate dobivene u uvjetima *in vitro* potvrdili smo u uzorcima koštane srži i periferne krvi bolesnika oboljelih od APL.

Analizom genskog izražaja utvrdili smo da su geni ID pojačano izraženi u stanicama NB4 i uzorcima koštane srži bolesnika koji boluju od APL. Njihov izražaj u stanicama NB4 dodatno potiču molekule BMP. Nadalje, obradom stanica ATRA-om uočili smo pojačan izražaj diferencijacijskih gena PU.1 i C/EBPε, a taj učinak zakočen je djelovanjem molekula BMP. Dokazali smo i značajnu pozitivnu korelaciju izražaja ukupnog receptora RARα, koji posreduje diferencijacijski učinak retinoične kiseline, i transkripcijskog čimbenika PU.1 u uzorcima koštane srži bolesnika koji boluju od APL. U istim uzorcima izražaj gena za cKit negativno korelira s izražajem onkogena PML/RARα, a pozitivno s izražajem ukupnog RARα, što upućuje na ulogu cKit u diferencijaciji leukemijskih stanica. Također, izražaj ukupnog receptora RARα negativno korelira s izražajem gena za BMP-6, a pozitivno s izražajem gena za BMP-antagonist BAMBI.

Na temelju navedenih rezultata zaključili smo da bi upravo geni, odnosno proteini ID, mogli posredovati anti-diferencijacijski učinak molekula BMP. Pri tome bi geni PU.1 i C/EBPε mogli biti odgovorni za interferenciju BMP-signala i diferencijacijskog djelovanja ATRA-e. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju važnost djelovanja molekula BMP u patogenezi APL, te upućuju na zaključak da bi molekule BMP mogle pridonositi razvoju rezistencije na djelovanje ATRA-e u bolesnika oboljelih od APL.

9. SUMMARY

Iva Topić Grahovac, MD*: Effect of bone morphogenetic proteins on differentiation of human promyelocytic leukemia cells, 2013.*

Acute promyelocytic leukemia (APL) is malignant hematologic disease characterized by translocation t(15;17). This translocation results in the formation of PML/RARα oncogene and accumulation of malignant promyelocytes that do not differentiate into mature granulocytes. Treatment of this type of leukemia is based on differentiation agents *all-trans* retinoic acid (ATRA) and arsenic-trioxide, which induce degradation and conformational changes of the oncogene PML/RARα. However, prolonged treatment with ATRA often results in relapse, due to development of ATRA resistance by leukemic cells, and serious side-effects.

In this research we aimed to investigate possible mechanisms of BMP-mediated suppression of ATRA-induced differentiation using myeloid leukemia cell lines NB4 and HL60. We used two myeloid leukemia cell lines: NB4, which carries the specific t(15;17) translocation, and HL60, a myeloblastic leukemia cell line that lacks t(15;17) translocation, to test if the BMP effect is PML/RARα specific. Cell lines were treated with ATRA and BMPs, and, in some experiments, BMP-antagonists NOGGIN.

ATRA induced differentiation of malignant promyelocytes into neutrophils in both tested cell lines. Addition of BMPs in ATRA-treated samples significantly reduced the percentage of differentiated cells. This anti-differentiation effect of BMPs was reversed by BMP-antagonist NOGGIN.

To investigate the mechanism of anti-differentiation effect of BMPs on ATRA-treated myeloid leukemia cell lines NB4 and HL60, we analyzed the expression pattern of several genes involved in proliferation, differentiation and apoptosis, which are, at the same time, involved in both BMP- and ATRA-signaling pathway. Those in vitro results were confirmed in bone marrow and peripheral blood samples of APL patients.

Gene expression analysis revealed induction of ID expression in both NB4 cell line and bone marrow APL samples. Addition of BMPs further enhanced ID gene expression in NB4 cells. Moreover, ATRA induced expression of differentiation genes PU.1 and C/EBPε. This effect was suppressed by combined treatment with ATRA and BMP. Also, we confirmed significant positive correlation between expression of total receptor RARα, important for differentiation effect of retinoic acid, and transcription factor PU.1 in bone marrow samples of APL patients. In the same samples, cKit expression negatively correlated with PML/RARα oncogene, but positively with total RARα, indicationg the role of cKit in differentiation of APL cells. Finally, the expression of total RARα was in negative correlation with BMP-6 and in positive correlation with BMP-antagonist BAMBI.

Based on the obtained results, we concluded that ID genes and proteins could mediate anti-differentation effect of BMPs. Also, our findings suggest that PU.1 and C/EBPε could be responsible for the interference of BMP-signal and ATRA-differentiation effect. Results of our investigation confirmed the important role of BMPs in the pathogenesis of APL, and indicate that BMP molecules may be involved in the development of ATRA-resistance in APL patients.

10. LITERATURA

1. Krause WJ. Special connective tissue: hematopoietic tissue. U: Schnittman ER JJ, ur. Essentials of histology. USA: Little, Brown and Company Inc.; 1996. str. 101-16.
2. Čulo F, Batinić, D. Stanice, tkiva i organi imunosnog sustava. U: Taradi M, ur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 50-7.
3. Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. Journal of blood medicine. 2010;1:13-9.
4. Jakšić B. Struktura i funkcija imunopoetskog sustava. U: Vrhovac B, ur. Interna medicina. Zagreb: Naprijed; 1997. str. 1087-126.
5. Parslow TG, Stites DP, Terr, A., Imboden J.B. Medical Immunology. New York: McGraw Hill; 2001.
6. Labar B, Hauptmann E. Organi hematopoeze. Hematologija. ZAGREB: Školska knjiga; 1998. str. 3-5.
7. Labar B, Hauptmann E. Hematopoetski sustav. U: Hematologija: Školska knjiga; 1998. str. 2.
8. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. Cell stem cell. 2012;10:120-36..
9. Labar B, Hauptmann E. Hematopoetske matične stanice. U: Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 1998. str. 6-7.
10. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature. 2000;404:193-7.
11. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell. 1997;91:661-72.
12. Gorgens A, Radtke S, Mollmann M, Cross M, Durig J, Horn PA, et al. Revision of the human hematopoietic tree: granulocyte subtypes derive from distinct hematopoietic lineages. Cell reports. 2013;3:1539-52.
13. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:7580-4.
14. Souza LM, Boone TC, Gabrilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. Science. 1986;232:61-5.
15. Namen AE, Lupton S, Hjerrild K, Wignall J, Mochizuki DY, Schmierer A, et al. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. Nature. 1988;333:571-3.
16. Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:5592-6.
17. Bronchud MH, Dexter TM. Clinical use of haematopoietic growth factors. Blood reviews. 1989;3:66-70.
18. Labar B, Hauptmann, E. Hematopoetski faktori rasta. U: Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 1996. str. 8-10.
19. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. Blood. 2008;111:485-91.
20. Labar B, Hauptmann, E. Akutne leukemije. U: Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 1996. str. 89-110.
21. Novooboljeli od raka u 2010. godini. Hrvatski registar za rak, Zagreb, Zavod za javno zdravstvo. (http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm)
22. Labar B. Akutne leukemije. U: Vrhovac B JB, Reiner Ž, Vucelić B., ur. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 992-1001.
23. Beattie MS, Copeland K, Fehniger J, Cheung E, Joseph G, Lee R, et al. Genetic Counseling, Cancer Screening, Breast Cancer Characteristics, and General Health among a Diverse Population of BRCA Genetic Testers. J Health Care Poor Underserved.. 2013;24:1150-66.

24. Malik MA, Gupta A, Zargar SA, Mittal B. Role of genetic variants of deleted in colorectal carcinoma (DCC) polymorphisms and esophageal and gastric cancers risk in Kashmir Valley and meta-analysis. Tumour Biol. 2013.
25. Gilsing AM, Franssen F, de Kok TM, Goldbohm RA, Schouten LJ, de Bruine AP, et al. Dietary heme iron and the risk of colorectal cancer with specific mutations in KRAS and APC. Carcinogenesis. 2013.
26. Labar B. Akutne leukemije. U: Vrhovac B, ur. Interna medicina. Zagreb: Naprijed; 1997. str. 1118-25.
27. Stein E, McMahon B, Kwaan H, Altman JK, Frankfurt O, Tallman MS. Best Pract Res Clin Haematol. 2009;22:153-63.
28. Avvisati G. Coagulopathy in APL: a step forward? Blood. 2012;120:4-6.
29. Peloquin GL, Chen YB, Fathi AT. The evolving landscape in the therapy of acute myeloid leukemia. Protein & cell. 2013.
30. van Eys J, Pullen J, Head D, Boyett J, Crist W, Falletta J, et al. The French-American-British (FAB) classification of leukemia. The Pediatric Oncology Group experience with lymphocytic leukemia. Cancer. 1986;57:1046-51.
31. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114:937-51.
32. Akashi K, Harada M, Shibuya T, Morioka E, Okamura T, Asano Y, et al. Clinical characteristics of hybrid leukemia: report of five cases. Leukemia research. 1990;14:145-53.
33. Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. Acta medica Scandinavica. 1957;159:189-94.
34. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Annals of internal medicine. 1985;103:620-5.
35. Zhou GB, Zhao WL, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Retinoic acid and arsenic for treating acute promyelocytic leukemia. PLoS medicine. 2005;2:e12.
36. Novodijagnosticirani i umrli od raka u 2010. godini. Hrvatski registar za rak, Zagreb, Zavod za javno zdravstvo. (http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm)
37. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. Nature. 1990;347:558-61.
38. Kakizuka A, Miller WH, Jr., Umesono K, Warrell RP, Jr., Frankel SR, Murty VV, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell. 1991;66:663-74.
39. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. Lancet. 1977;1:549-50.
40. Benoit G, Roussel M, Pendino F, Segal-Bendirdjian E, Lanotte M. Orchestration of multiple arrays of signal cross-talk and combinatorial interactions for maturation and cell death: another vision of t(15;17) preleukemic blast and APL-cell maturation. Oncogene. 2001;20:7161-77.
41. Grignani F, Ferrucci PF, Testa U, Talamo G, Fagioli M, Alcalay M, et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. Cell. 1993;74:423-31.
42. Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program. 2003:82-101.
43. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. Oncogene. 2001;20:7186-203.
44. Rego EM, Ruggero D, Tribioli C, Cattoretti G, Kogan S, Redner RL, et al. Leukemia with distinct phenotypes in transgenic mice expressing PML/RAR alpha, PLZF/RAR alpha or NPM/RAR alpha. Oncogene. 2006;25:1974-9.

45. Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, et al. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). Blood. 1995;85:1083-94.
46. Guidez F, Ivins S, Zhu J, Soderstrom M, Waxman S, Zelent A. Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1998;91:2634-42.
47. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, Groupe de Francais d'Hematologie Cellulaire, UK Cancer Cytogenetics Group and BIOMED 1 European Community-Concerted Action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". Blood. 2000;96:1297-308.
48. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood. 2009;113:4179-87.
49. Douer D, Preston-Martin S, Chang E, Nichols PW, Watkins KJ, Levine AM. High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. Blood. 1996;87:308-13.
50. de Botton S, Coiteux V, Chevret S, Rayon C, Vilmer E, Sanz M, et al. Outcome of childhood acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and chemotherapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2004;22:1404-12.
51. Testi AM, Biondi A, Lo Coco F, Moleti ML, Giona F, Vignetti M, et al. GIMEMA-AIEOPAIDA protocol for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) in children. Blood. 2005;106:447-53.
52. Ortega JJ, Madero L, Martin G, Verdeguer A, Garcia P, Parody R, et al. Treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for children with acute promyelocytic leukemia: a multicenter study by the PETHEMA Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23:7632-40.
53. Guglielmi C, Martelli MP, Diverio D, Fenu S, Vegna ML, Cantu-Rajnoldi A, et al. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. British journal of haematology. 1998;102:1035-41.
54. Maule MM, Dama E, Mosso ML, Magnani C, Pastore G, Merletti F. High incidence of acute promyelocytic leukemia in children in northwest Italy, 1980-2003: a report from the Childhood Cancer Registry of Piedmont. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. 2008;22:439-41.
55. Sanz MA, Lo Coco F, Martin G, Avvisati G, Rayon C, Barbui T, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. Blood. 2000;96:1247-53.
56. Tallman MS, Hakimian D, Kwaan HC, Rickles FR. New insights into the pathogenesis of coagulation dysfunction in acute promyelocytic leukemia. Leukemia & lymphoma. 1993;11:27-36.
57. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Hypergranular promyelocytic leukemia: correlation between morphology and chromosomal translocations including t(15;17) and t(11;17). Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. 2000;14:1197-200.
58. Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. Blood. 2009;114:5126-35.
59. de Botton S, Chevret S, Coiteux V, Dombret H, Sanz M, San Miguel J, et al. Early onset of chemotherapy can reduce the incidence of ATRA syndrome in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL) with low white blood cell counts: results from APL 93 trial.

Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. 2003;17:339-42.
60. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. Blood. 2008;111:2505-15.
61. Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1995;85:2643-53.
62. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1980;77:2936-40.
63. Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. Blood. 1981;57:1000-4.
64. Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhoa L, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1988;72:567-72.
65. Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. Blood. 1999;93:3167-215.
66. Liu TX, Zhang JW, Tao J, Zhang RB, Zhang QH, Zhao CJ, et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. Blood. 2000;96:1496-504.
67. Lee KH, Chang MY, Ahn JI, Yu DH, Jung SS, Choi JH, et al. Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. Biochemical and biophysical research communications. 2002;296:1125-33.
68. Martin SJ, Bradley JG, Cotter TG. HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. Clinical and experimental immunology. 1990;79:448-53.
69. Gillis JC, Goa KL. Tretinoin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and use in the management of acute promyelocytic leukaemia. Drugs. 1995;50:897-923.
70. Lo Coco F, Nervi C, Avvisati G, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: a curable disease. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK. 1998;12:1866-80.
71. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Berger R, Miclea JM, Ballerini P, et al. Retinoic acids in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Nouv Rev Fr Hematol. 1990;32:36-8.
72. Zeng Y, Yang Z, Han YY, You C. [Impact of all-trans retinoic acid on gene expression profile of glioblastoma cell line SHG-44]. Ai Zheng. 2008;27:482-90.
73. Rocca B, Morosetti R, Habib A, Maggiano N, Zassadowski F, Ciabattoni G, et al. Cyclooxygenase-1, but not -2, is upregulated in NB4 leukemic cells and human primary promyelocytic blasts during differentiation. Leukemia. 2004;18:1373-9.
74. Kini AR, Peterson LA, Tallman MS, Lingen MW. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. Blood. 2001;97:3919-24.
75. Zhu J, Guo WM, Yao YY, Zhao WL, Pan L, Cai X, et al. Tissue factors on acute promyelocytic leukemia and endothelial cells are differently regulated by retinoic acid, arsenic trioxide and chemotherapeutic agents. Leukemia. 1999;13:1062-70.
76. Wang J, Peng Y, Sun YW, He H, Zhu S, An X, et al. All-trans retinoic acid induces XAF1 expression through an interferon regulatory factor-1 element in colon cancer. Gastroenterology. 2006;130:747-58.
77. Bertagnolo V, Marchisio M, Capitani S, Neri LM. Intranuclear translocation of phospholipase C beta2 during HL-60 myeloid differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 1997;235:831-7.
78. Idres N, Benoit G, Flexor MA, Lanotte M, Chabot GG. Granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells induced by all-trans retinoic acid metabolites. Cancer Res. 2001;61:700-5.

79. Murata-Ohsawa M, Tohda S, Kogoshi H, Sakano S, Nara N. The Notch ligand, Delta-1, alters retinoic acid (RA)-induced neutrophilic differentiation into monocytic and reduces RA-induced apoptosis in NB4 cells. Leuk Res. 2005;29:197-203.
80. Kambhampati S, Li Y, Verma A, Sassano A, Majchrzak B, Deb DK, et al. Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. J Biol Chem. 2003;278:32544-51.
81. Alsayed Y, Uddin S, Mahmud N, Lekmine F, Kalvakolanu DV, Minucci S, et al. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. J Biol Chem. 2001;276:4012-9.
82. Matsui W, Smith BD, Vala M, Beal N, Huff CA, Diehl LF, et al. Requirement for myeloid growth factors in the differentiation of acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol. 2005;128:853-62.
83. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. Nat Med. 2001;7:680-6.
84. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. Blood. 1990;76:1704-9.
85. Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, et al. A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. Blood. 1999;94:1192-200.
86. Fenaux P, Chevret S, Guerci A, Fegueux N, Dombret H, Thomas X, et al. Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. European APL group. Leukemia. 2000;14:1371-7.
87. Sanz MA, Martin G, Rayon C, Esteve J, Gonzalez M, Diaz-Mediavilla J, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia. PETHEMA group. Blood. 1999;94:3015-21.
88. Sanz MA, Martin G, Gonzalez M, Leon A, Rayon C, Rivas C, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. Blood. 2004;103:1237-43.
89. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Breccia M, Gallo E, Rambaldi A, et al. Front-line treatment of acute promyelocytic leukemia with AIDA induction followed by risk-adapted consolidation for adults younger than 61 years: results of the AIDA-2000 trial of the GIMEMA Group. Blood. 2010;116:3171-9.
90. Imaizumi M, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Tabuchi K, Kigasawa H, et al. Prospective study of a therapeutic regimen with all-trans retinoic acid and anthracyclines in combination of cytarabine in children with acute promyelocytic leukaemia: the Japanese childhood acute myeloid leukaemia cooperative study. Br J Haematol. 2011;152:89-98.
91. Zhang P, Wang, S.Y., Hu, L.H. Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. Chin J of Hematol. 1995;17:58-62.
92. Wang ZY. Ham-Wasserman lecture: treatment of acute leukemia by inducing differentiation and apoptosis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2003:1-13.
93. Niu C, Yan H, Yu T, Sun HP, Liu JX, Li XS, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. Blood. 1999;94:3315-24.
94. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. J Clin Oncol. 2001;19:3852-60.

95. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. N Engl J Med. 1998;339:1341-8.
96. Lu DP, Qiu JY, Jiang B, Wang Q, Liu KY, Liu YR, et al. Tetra-arsenic tetra-sulfide for the treatment of acute promyelocytic leukemia: a pilot report. Blood. 2002;99:3136-43.
97. Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, et al. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As2O3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. Blood. 1997;89:3345-53.
98. Nasr R, Guillemin MC, Ferhi O, Soilihi H, Peres L, Berthier C, et al. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. Nat Med. 2008;14:1333-42.
99. Camacho LH, Soignet SL, Chanel S, Ho R, Heller G, Scheinberg DA, et al. Leukocytosis and the retinoic acid syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide. J Clin Oncol. 2000;18:2620-5.
100. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, Appelbaum FR, Feusner JH, Ogden A, et al. Clinical description of 44 patients with acute promyelocytic leukemia who developed the retinoic acid syndrome. Blood. 2000;95:90-5.
101. Hu J, Liu YF, Wu CF, Xu F, Shen ZX, Zhu YM, et al. Long-term efficacy and safety of all-trans retinoic acid/arsenic trioxide-based therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:3342-7.
102. Sampath KT. Bone morphogenetic proteins and their role in regenerative medicine. U: Vukicevic S, Sampath, K.T., ur. Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond: Birkhauser Verlag; 2004. str. 1-8.
103. Martinovic S, Mazic S, Kisic V, Basic N, Jakic-Razumovic J, Borovecki F, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in stromal cells from human bone marrow long-term culture. J Histochem Cytochem. 2004;52:1159-67.
104. 104. Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, et al. Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. Mol Cell Biol. 1994;14:5961-74.
105. Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, et al. Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. J Cell Biol. 1995;130:217-26.
106. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, et al. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. Cell. 1996;85:489-500.
107. Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. Nat Rev Genet. 2003;4:763-73.
108. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors. 2004;22:233-41.
109. Thawani JP, Wang AC, Than KD, Lin CY, La Marca F, Park P. Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. Neurosurgery. 2010;66:233-46.
110. Snyder A, Fraser ST, Baron MH. Bone morphogenetic proteins in vertebrate hematopoietic development. J Cell Biochem. 2004;93:224-32.
111. Kishigami S, Mishina Y. BMP signaling and early embryonic patterning. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16:265-78.
112. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15:1-11.
113. Korchynsky O, Bezooijen, RL, Lowik, CW, ten Dijke P. Bone morphogenetic proteins and their nuclear effectors in bone formation. In: Vukicevic S, Sampath, K.T., ur. Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and Beyond: Birkhauser Verlag; 2004. str. 9-44.
114. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. Nature. 1997;389:622-6.
115. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev. 2000;14:627-44.

116. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2009;41:263-72.
117. Horiki M, Imamura T, Okamoto M, Hayashi M, Murai J, Myoui A, et al. Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. J Cell Biol. 2004;165:433-45.
118. Zhao M, Qiao M, Harris SE, Oyajobi BO, Mundy GR, Chen D. Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. J Biol Chem. 2004;279:12854-9.
119. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, et al. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. Nature. 2002;420:636-42.
120. Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. Cell. 1996;86:589-98.
121. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. Molecular cell. 1998;1:673-83.
122. Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, et al. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. Endocrinology. 2003;144:1972-8.
123. Zhang D, Ferguson CM, O'Keefe RJ, Puzas JE, Rosier RN, Reynolds PR. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. J Bone Miner Res. 2002;17:293-300.
124. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988;242:1528-34.
125. Nishida Y, Knudson CB, Kuettner KE, Knudson W. Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. Osteoarthritis Cartilage. 2000;8:127-36.
126. Zhao YP, Tian QY, Frenkel S, Liu CJ. The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling. Biomaterials. 2013;34:6412-21.
127. Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:18023-7.
128. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. J Cell Biol. 1994;127:1755-66.
129. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. Endocr Rev. 2000;21:393-411.
130. Grgurevic L, Macek B, Mercep M, Jelic M, Smoljanovic T, Erjavec I, et al. Bone morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair. Biochem Biophys Res Commun. 2011;408:25-31.
131. Smoljanovic T, Grgurevic L, Jelic M, Kreszinger M, Haspl M, Maticic D, et al. Regeneration of the skeleton by recombinant human bone morphogenetic proteins. Coll Antropol. 2007;31:923-32.
132. Khan SN, Lane JM. The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. Expert Opin Biol Ther. 2004;4:741-8.
133. White AP, Vaccaro AR, Hall JA, Whang PG, Friel BC, McKee MD. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. Int Orthop. 2007;31:735-41.
134. Smith DM, Afifi AM, Cooper GM, Mooney MP, Marra KG, Losee JE. BMP-2-based repair of large-scale calvarial defects in an experimental model: regenerative surgery in cranioplasty. J Craniofac Surg. 2008;19:1315-22.
135. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. Genes Dev. 1996;10:1580-94.

136. Clement JH, Fettes P, Knochel S, Lef J, Knochel W. Bone morphogenetic protein 2 in the early development of Xenopus laevis. Mech Dev. 1995;52:357-70.
137. Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK. Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. Biochem Biophys Res Commun. 1994;198:693-700.
138. Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16:299-308.
139. Grgurevic L, Macek B, Healy DR, Brault AL, Erjavec I, Cipcic A, et al. Circulating bone morphogenetic protein 1-3 isoform increases renal fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2011;22:681-92.
140. Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. Nat Genet. 2009;41:482-7.
141. Klose A, Waerzeggers Y, Monfared P, Vukicevic S, Kaijzel EL, Winkeler A, et al. Imaging bone morphogenetic protein 7 induced cell cycle arrest in experimental gliomas. Neoplasia. 2011;13:276-85.
142. Vukicevic S, Grgurevic L. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. Cytokine Growth Factor Rev. 2009;20:441-8.
143. Baron MH. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. Exp Hematol. 2003;31:1160-9.
144. Soderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. Ann N Y Acad Sci. 2009;1176:55-69.
145. Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. Oncogene. 2005;24:5676-92.
146. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. J Exp Med. 1999;189:1139-48.
147. Detmer K, Steele TA, Shoop MA, Dannawi H. Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines. Blood Cells Mol Dis. 1999;25:310-23.
148. Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S, Nakao A, Tamaki K, Nonaka K, et al. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. J Biol Chem. 1999;274:13637-42.
149. Fukuda N, Saitoh M, Kobayashi N, Miyazono K. Execution of BMP-4-induced apoptosis by p53-dependent ER dysfunction in myeloma and B-cell hybridoma cells. Oncogene. 2006;25:3509-17.
150. Kawamura C, Kizaki M, Ikeda Y. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. Leuk Lymphoma. 2002;43:635-9.
151. Maeno M, Mead PE, Kelley C, Xu RH, Kung HF, Suzuki A, et al. The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in Xenopus laevis. Blood. 1996;88:1965-72.
152. Johansson BM, Wiles MV. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. Mol Cell Biol. 1995;15:141-51.
153. Grcevic D, Marusic A, Grahovac B, Jaksic B, Kusec R. Expression of bone morphogenetic proteins in acute promyelocytic leukemia before and after combined all trans-retinoic acid and cytotoxic treatment. Leuk Res. 2003;27:731-8.
154. Zavadil J, Brezinova J, Svoboda P, Zemanova Z, Michalova K. Smad5, a tumor suppressor candidate at 5q31.1, is hemizygously lost and not mutated in the retained allele in human leukemia cell line HL60. Leukemia. 1997;11:1187-92.
155. Drexler HG, Matsuo AY, MacLeod RA. Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. Leuk Res. 2000;24:881-911.
156. Rucker FG, Sander S, Dohner K, Dohner H, Pollack JR, Bullinger L. Molecular profiling reveals myeloid leukemia cell lines to be faithful model systems characterized by distinct genomic aberrations. Leukemia. 2006;20:994-1001.

157. MacLeod RA, Nagel S, Scherr M, Schneider B, Dirks WG, Uphoff CC, et al. Human leukemia and lymphoma cell lines as models and resources. Curr Med Chem. 2008;15:339-59.
158. Drexler HG, Minowada J. History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. Leuk Lymphoma. 1998;31:305-16.
159. 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;77:1080-6.
160. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature. 1977;270:347-9.
161. Barak Y, Shore NA, Higgins GR, Vadakan VV. Functional cellular maturation in cultures of human haematopoietic cells. British journal of haematology. 1974;27:543-9.
162. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood. 1975;45:321-34.
163. 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;54:713-33.
164. Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM. HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. Blood. 1988;71:242-7.
165. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc Natl Acad Sci USA. 1978;75:2458-62.
166. Kizaki M, Matsushita H, Takayama N, Muto A, Ueno H, Awaya N, et al. Establishment and characterization of a novel acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) with retinoic acid-resistant features. Blood. 1996;88:1824-33.
167. Kishi K, Toba K, Azegami T, Tsukada N, Uesugi Y, Masuko M, et al. Hematopoietic cytokine-dependent differentiation to eosinophils and neutrophils in a newly established acute promyelocytic leukemia cell line with t(15;17). Exp Hematol. 1998;26:135-42.
168. Sun Y, Kim SH, Zhou DC, Ding W, Paietta E, Guidez F, et al. Acute promyelocytic leukemia cell line AP-1060 established as a cytokine-dependent culture from a patient clinically resistant to all-trans retinoic acid and arsenic trioxide. Leukemia. 2004;18:1258-69.
169. Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA, Uphoff CC, Hu ZB. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. Leuk Res. 1995;19:681-91.
170. Grcevic D, Kusec R, Kovacic N, Lukic A, Lukic IK, Ivcevic S, et al. Bone morphogenetic proteins and receptors are over-expressed in bone-marrow cells of multiple myeloma patients and support myeloma cells by inducing ID genes. Leuk Res. 2010;34:742-51.
171. Warrell RP, Jr., de The H, Wang ZY, Degos L. Acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med. 1993;329:177-89.
172. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods. 1995;184:39-51.
173. Kinjo K, Kizaki M, Muto A, Fukuchi Y, Umezawa A, Yamato K, et al. Arsenic trioxide (As2O3)-induced apoptosis and differentiation in retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in hGM-CSF-producing transgenic SCID mice. Leukemia. 2000;14:431-8. Epub
174. Roussel MJ, Lanotte M. Maturation sensitive and resistant t(15;17) NB4 cell lines as tools for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. Oncogene. 2001;20:7287-91.
175. Zhang JW, Wang JY, Chen SJ, Chen Z. Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. J Biosci. 2000;25:275-84.
176. Liu MJ, Wang Z, Wu RC, Sun SQ, Wu QY. Monitoring all-trans-retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia NB4 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. Leukemia. 2003;17:1670-4.

177. Mengubas K, Riordan FA, Hoffbrand AV, Wickremasinghe RG. Co-ordinated downregulation of bcl-2 and bax expression during granulocytic and macrophage-like differentiation of the HL60 promyelocytic leukaemia cell line. FEBS Lett. 1996;394:356-60.
178. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Biol Chem. 2008;283:20948-58.
179. Liu H, Zhang R, Chen D, Oyajobi BO, Zhao M. Functional redundancy of type II BMP receptor and type IIB activin receptor in BMP2-induced osteoblast differentiation. J Cell Physiol. 2012;227:952-63.
180. Zhang Y, Zhang DY, Zhao YF, Wang J, He JW, Luo J. Analysis and characterization of the functional TGFbeta receptors required for BMP6-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. BMB Rep. 2013;46:107-12.
181. Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. J Biol Chem. 1999;274:19838-45.
182. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol. 1995;146:3-15.
183. Cooper CL, Newburger PE. Differential expression of Id genes in multipotent myeloid progenitor cells: Id-1 is induced by early-and late-acting cytokines while Id-2 is selectively induced by cytokines that drive terminal granulocytic differentiation. J Cell Biochem. 1998;71:277-85.
184. Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. Oncogene. 2001;20:8326-33.
185. Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. Genes Cells. 2002;7:949-60.
186. Thoren LA, Liuba K, Bryder D, Nygren JM, Jensen CT, Qian H, et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. J Immunol. 2008;180:2045-53.
187. Marshall CJ, Sinclair JC, Thrasher AJ, Kinnon C. Bone morphogenetic protein 4 modulates c-Kit expression and differentiation potential in murine embryonic aorta-gonad-mesonephros haematopoiesis in vitro. Br J Haematol. 2007;139:321-30.
188. Vickers M, Jackson G, Taylor P. The incidence of acute promyelocytic leukemia appears constant over most of a human lifespan, implying only one rate limiting mutation. Leukemia. 2000;14:722-6.
189. Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol. 2003;16:357-67.
190. Matasar MJ, Ritchie EK, Consedine N, Magai C, Neugut AI. Incidence rates of acute promyelocytic leukemia among Hispanics, blacks, Asians, and non-Hispanic whites in the United States. Eur J Cancer Prev. 2006;15:367-70.
191. Pulsoni A, Pagano L, Lo Coco F, Avvisati G, Mele L, Di Bona E, et al. Clinicobiological features and outcome of acute promyelocytic leukemia occurring as a second tumor: the GIMEMA experience. Blood. 2002;100:1972-6.
192. Beaumont M, Sanz M, Carli PM, Maloisel F, Thomas X, Detourmignies L, et al. Therapy-related acute promyelocytic leukemia. J Clin Oncol. 2003;21:2123-37.
193. Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, et al. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med. 2005;352:1529-38.
194. Puccetti E, Ruthardt M. Acute promyelocytic leukemia: PML/RARalpha and the leukemic stem cell. Leukemia. 2004;18:1169-75.
195. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2009;113:1875-91.
196. Frankel SR, Eardley A, Lauwers G, Weiss M, Warrell RP, Jr. The "retinoic acid syndrome" in acute promyelocytic leukemia. Ann Intern Med. 1992;117:292-6.

197. Tallman MS, Altman JK. Curative strategies in acute promyelocytic leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008:391-9.
198. Lallemand-Breitenbach V, de The H. A new oncoprotein catabolism pathway. Blood. 2010;116:2200-1.
199. Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, et al. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. Cancer Res. 1996;56:2945-8.
200. Collins SJ, Robertson KA, Mueller L. Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR-alpha). Mol Cell Biol. 1990;10:2154-63.
201. Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. Cancer Res. 2002;62:3893-903.
202. Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z. Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. Oncogene. 2001;20:7146-53.
203. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. N Engl J Med. 2013;369:111-21.
204. Montesinos P, Bergua JM, Vellenga E, Rayon C, Parody R, de la Serna J, et al. Differentiation syndrome in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline chemotherapy: characteristics, outcome, and prognostic factors. Blood. 2009;113:775-83.
205. Doyle BT, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM, Watson RW. Differentiation-induced HL-60 cell apoptosis: a mechanism independent of mitochondrial disruption? Apoptosis. 2004;9:345-52.
206. Kluza J, Lansiaux A, Wattez N, Mahieu C, Osheroff N, Bailly C. Apoptotic response of HL-60 human leukemia cells to the antitumor drug TAS-103. Cancer Res. 2000;60:4077-84.
207. Otake Y, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Spicer EK, Fernandes DJ. Retinoid-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with nucleolin down-regulation and destabilization of Bcl-2 mRNA. Mol Pharmacol. 2005;67:319-26.
208. Ozeki M, Shively JE. Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells. J Leukoc Biol. 2008;84:769-79.
209. Hui EK, Yung BY. Cell cycle phase-dependent effect of retinoic acid on the induction of granulocytic differentiation in HL-60 promyelocytic leukemia cells. Evidence for sphinganine potentiation of retinoic acid-induced differentiation. FEBS Lett. 1993;318:193-9.
210. Nigten J, Breems-de Ridder MC, Erpelinck-Verschueren CA, Nikoloski G, van der Reijden BA, van Wageningen S, et al. ID1 and ID2 are retinoic acid responsive genes and induce a G0/G1 accumulation in acute promyelocytic leukemia cells. Leukemia. 2005;19:799-805.
211. Bartsch D, Hahn SA, Danichevski KD, Ramaswamy A, Bastian D, Galehdari H, et al. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. Oncogene. 1999;18:2367-71.
212. Hahn SA, Bartsch D, Schroers A, Galehdari H, Becker M, Ramaswamy A, et al. Mutations of the DPC4/Smad4 gene in biliary tract carcinoma. Cancer Res. 1998;58:1124-6.
213. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. Nat Genet. 1996;13:343-6.
214. Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. Blood. 2000;96:2005-11.
215. Topic I, Ikic M, Ivcevic S, Kovacic N, Marusic A, Kusec R, et al. Bone morphogenetic proteins regulate differentiation of human promyelocytic leukemia cells. Leukemia Res. 2013;37:705-12.
216. Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, et al. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. Nat Med. 2003;9:1033-8.

217. Sumantran VN, Brederlau A, Funa K. BMP-6 and retinoic acid synergistically differentiate the IMR-32 human neuroblastoma cells. Anticancer Res. 2003;23:1297-303.
218. Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling. Sci STKE. 2002;2002.
219. Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. J Cell Sci. 2000;113:3897-905.
220. Fong S, Itahana Y, Sumida T, Singh J, Coppe JP, Liu Y, et al. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:13543-8.
221. Ruzinova MB, Schoer RA, Gerald W, Egan JE, Pandolfi PP, Rafii S, et al. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. Cancer cell. 2003;4:277-89.
222. Voronova AF, Lee F. The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate in vivo and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:5952-6.
223. Ishiguro A, Spirin KS, Shiohara M, Tobler A, Gombart AF, Israel MA, et al. Id2 expression increases with differentiation of human myeloid cells. Blood. 1996;87:5225-31.
224. van Wageningen S, Breems-de Ridder MC, Nigten J, Nikoloski G, Erpelinck-Verschueren CA, Lowenberg B, et al. Gene transactivation without direct DNA binding defines a novel gain-of-function for PML-RARalpha. Blood. 2008;111:1634-43.
225. Buitenhuis M, van Deutekom HW, Verhagen LP, Castor A, Jacobsen SE, Lammers JW, et al. Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix-loop-helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2. Blood. 2005;105:4272-81.
226. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. Cell. 2003;115:281-92.
227. Kamaid A, Neves J, Giraldez F. Id gene regulation and function in the prosensory domains of the chicken inner ear: a link between Bmp signaling and Atoh1. J Neurosci. 2010;30:11426-34.
228. Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. J Cancer Res Clin Oncol. 2000;126:271-9.
229. Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M. Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:9219-22.
230. Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. Ann Thorac Surg. 2005;80:1028-32.
231. Du Y, Yip H. Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. Differentiation. 2010;79:84-92.
232. Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, et al. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:5868-73.
233. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB, et al. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3. Exp Hematol. 2006;34:72-81.
234. Kohroki J, Fujita S, Itoh N, Yamada Y, Imai H, Yumoto N, et al. ATRA-regulated Asb-2 gene induced in differentiation of HL-60 leukemia cells. FEBS Lett. 2001;505:223-8.
235. 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;107:3330-8.
236. Hattori H, Zhang X, Jia Y, Subramanian KK, Jo H, Loison F, et al. RNAi screen identifies UBE2D3 as a mediator of all-trans retinoic acid-induced cell growth arrest in human acute promyelocytic NB4 cells. Blood. 2007;110:640-50.

237. Chih DY, Chumakov AM, Park DJ, Silla AG, Koeffler HP. Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/enhancer binding protein gene (C/EBP epsilon). Blood. 1997;90:2987-94.
238. Haga SB, Fu S, Karp JE, Ross DD, Williams DM, Hankins WD, et al. BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. Leukemia. 2000;14:1867-75.
239. Hu ZB, Ma W, Uphoff CC, Quentmeier H, Drexler HG. c-kit expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines. Blood. 1994;83:2133-44.
240. Pisani F, Del Poeta G, Aronica G, Venditti A, Caravita T, Amadori S. In vitro down-regulation of bcl-2 expression by all-trans retinoic acid in AML blasts. Ann Hematol. 1997;75:145-7.
241. Lee GT, Jung YS, Lee JH, Kim WJ, Kim IY. Bone morphogenetic protein 6-induced interleukin-1beta expression in macrophages requires PU.1/Smad1 interaction. Mol Immunol. 2011;48:1540-7.
242. Fux C, Mitta B, Kramer BP, Fussenegger M. Dual-regulated expression of C/EBP-alpha and BMP-2 enables differential differentiation of C2C12 cells into adipocytes and osteoblasts. Nucleic Acids Res. 2004;32:e1.
243. Lei ZN, Liu F, Zhang LM, Huang YL, Sun FY. Bcl-2 increases stroke-induced striatal neurogenesis in adult brains by inhibiting BMP-4 function via activation of beta-catenin signaling. Neurochem Int. 2012;61:34-42.
244. Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. Cell. 1990;61:113-24.
245. Chen HM, Zhang P, Voso MT, Hohaus S, Gonzalez DA, Glass CK, et al. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. Blood. 1995;85:2918-28.
246. Nutt SL, Metcalf D, D'Amico A, Polli M, Wu L. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. J Exp Med. 2005;201:221-31.
247. Mueller BU, Pabst T, Hauser P, Neuberg D, Tenen DG. Mutations of the transcription factor PU.1 are not associated with acute lymphoblastic leukaemia. Br J Cancer. 2006;94:1918-20.
248. Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, et al. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. Mol Cell Biol. 1996;16:2453-63.
249. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. Nat Genet. 2004;36:624-30.
250. Mueller BU, Pabst T. C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. Curr Opin Hematol. 2006;13:7-14.
251. Park DJ, Chumakov AM, Vuong PT, Chih DY, Gombart AF, Miller WH, Jr., et al. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. J Clin Invest. 1999;103:1399-408.
252. Cammenga J, Mulloy JC, Berguido FJ, MacGrogan D, Viale A, Nimer SD. Induction of C/EBPalpha activity alters gene expression and differentiation of human CD34+ cells. Blood. 2003;101:2206-14.
253. Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. Mol Cell Biol. 1998;18:4301-14.
254. Fears S, Gavin M, Zhang DE, Hetherington C, Ben-David Y, Rowley JD, et al. Functional characterization of ETV6 and ETV6/CBFA2 in the regulation of the MCSFR proximal promoter. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:1949-54.
255. Morosetti R, Park DJ, Chumakov AM, Grillier I, Shiohara M, Gombart AF, et al. A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. Blood. 1997;90:2591-600.
256. Nerlov C. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. Curr Opin Cell Biol. 2008;20:180-5.

257. Zauberman A, Lapter S, Zipori D. Smad proteins suppress CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta- and STAT3-mediated transcriptional activation of the haptoglobin promoter. J Biol Chem. 2001;276:24719-25.
258. Awwad RT, Do K, Stevenson H, Fu SW, Lo-Coco F, Costello M, et al. Overexpression of BP1, a homeobox gene, is associated with resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. Ann Hematol. 2008;87:195-203.
259. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. Adv Hematol. 2012;2012:524308.
260. Bruel A, Benoit G, De Nay D, Brown S, Lanotte M. Distinct apoptotic responses in maturation sensitive and resistant t(15;17) acute promyelocytic leukemia NB4 cells. 9-cis retinoic acid induces apoptosis independent of maturation and Bcl-2 expression. Leukemia. 1995;9:1173-84.
261. Attisano L, Wrana JL. Smads as transcriptional co-modulators. Curr Opin Cell Biol. 2000;12:235-43.
262. La P, Morgan TA, Sykes SM, Mao H, Schnepp RW, Petersen CD, et al. Fusion proteins of retinoid receptors antagonize TGF-beta-induced growth inhibition of lung epithelial cells. Oncogene. 2003;22:198-210.
263. Suh HC, Leeanansaksiri W, Ji M, Klarmann KD, Renn K, Gooya J, et al. Id1 immortalizes hematopoietic progenitors in vitro and promotes a myeloproliferative disease in vivo. Oncogene. 2008;27:5612-23.
264. Strobl H, Takimoto M, Majdic O, Hocker P, Knapp W. Antigenic analysis of human haemopoietic progenitor cells expressing the growth factor receptor c-kit. Br J Haematol. 1992;82:287-94.
265. Buhring HJ, Ullrich A, Schaudt K, Muller CA, Busch FW. The product of the proto-oncogene c-kit (P145c-kit) is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells. Leukemia. 1991;5:854-60.
266. Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Manzo C, Vacca C, Ferrara F, et al. Stem cell factor receptor (c-kit, CD117) is expressed on blast cells from most immature types of acute myeloid mallignancies but is also a characteristic of a subset of acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol. 1996;92:562-4.
267. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. Blood. 1997;90:1345-64.
268. Kanakura Y, Ikeda H, Kitayama H, Sugahara H, Furitsu T. Expression, function and activation of the proto-oncogene c-kit product in human leukemia cells. Leuk Lymphoma. 1993;10:35-41.
269. Orfao A, Ortuno F, de Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. Cytometry A. 2004;58:62-71.
270. Sheng N, Xie Z, Wang C, Bai G, Zhang K, Zhu Q, et al. Retinoic acid regulates bone morphogenic protein signal duration by promoting the degradation of phosphorylated Smad1. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:18886-91.
271. Shigeno K, Naito K, Sahara N, Kobayashi M, Nakamura S, Fujisawa S, et al. Arsenic trioxide therapy in relapsed or refractory Japanese patients with acute promyelocytic leukemia: updated outcomes of the phase II study and postremission therapies. Int J Hematol. 2005;82:224-9.
272. Au WY, Lie AK, Chim CS, Liang R, Ma SK, Chan CH, et al. Arsenic trioxide in comparison with chemotherapy and bone marrow transplantation for the treatment of relapsed acute promyelocytic leukaemia. Ann Oncol. 2003;14:752-7.
273. Lo-Coco F, Cimino G, Breccia M, Noguera NI, Diverio D, Finolezzi E, et al. Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. Blood. 2004;104:1995-9.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:	Iva Topić Grahovac
Adresa:	Petra Grgeca 4, 10000 Zagreb
Telefon:	098/287 680, 01/ 6110 804
E-mail:	itopic@mef.hr
Datum rođenja:	17. studenog 1979. u Zagrebu

OBRAZOVANJE

2006-2011.	Specijalizacija iz otorinolaringologije.
2007-2011.	Stručni poslijediplomski studij „Otorinolaringologija i kirurgija glave i vrata“.
2007- 2011.	Znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“.
1998-2004.	Medicinski fakultet u Zagrebu, smjer doktor medicine.
1994-1998.	V. prirodoslovno-matematička gimnazija u Zagrebu.
1986-1994.	Osnovna škola u Zagrebu.

RADNO ISKUSTVO

2011-	Odjelni liječnik u specijalističkom zavodu za dječju otorinolaringologiju Klinike za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata, KBC Zagreb
2006-2011.	Specijalizant na Klinici za bolesti uha, nosa i grla, kirurgiju glave i vrata, KBC Zagreb.
2004-2006.	Znanstveni novak-asistent na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
2004-2005.	Pripravnički staž za doktora medicine u KBC „Sestre Milosrdnice“.

STRANI JEZICI

Odlično se služim engleskim, vrlo dobro govorim talijanski te poznajem osnove njemačkog i španjolskog jezika.

ZNANSTVENI RADOVI

1. Grahovac G, Brkljacic T, **Topic I**, Habek M. Attitudes towards organ donation among medical students. Med Teach. 2006;28:745.
2. **Topic I**, Brkljacic T, Grahovac G. Survey of medical students about attitudes toward organ donation. Dial Transplant. 2006;35:571-4,567,577-8.
3. Salopek D, Dujmovic A, Hadjina J, **Topic I**. Bilateral arterial and nervous variations in the human upper limb: a case report. Ann Anat. 2007;189:290-4.
4. Petrovecki V, Salopek D, **Topic I**, Marusic A. Chronic Unreduced Anterior Shoulder Dislocation: Application of Anatomy to Forensic Identification. Am J Forensic Med Pathol. 2008;29:89-91.
5. Kovac L, Bilic M, Bumber B, **Topic I**. Primary laryngeal manifestation in precursor T- Cell acute lymphoblastic leukemia. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;139:474-5.
6. Kovac L, Bumber B, Bilic M, Hutinec Z, **Topic I**. Pathology quiz case: Wegeners granulomatosis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;134:1116, 1118.
7. Klepac N, Hajnsek S, **Topic I**, Zarkovic K, Ozretic D, Habek M. Radiology quiz case 1. Lipoma of the CPA.. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2009;135:828.
8. Vilendecic M, Grahovac G, Lambasa S, Jelec V, **Topic I**. Unrecognized hemangiopericytoma of posterior cervical region with intracranial extension. J Craniomaxillofac Surg. 2011 Feb 21.
9. Tomac D, Chudy D, Lambaša S, **Topić I**, Grahovac G, Zoric A. Extracranial propagation of glioblastoma with extension to pterygomaxillar fossa. World J Surg Oncol. 2011,19;9:53.
10. Grahovac G, Vilendecic M, Vukelic-Markovic M, **Topic I**, Lambasa S. An unexpected obstacle A retrorectal mass went undetected until the patient was in labor. Am J Obstet Gynecol. 2011;205:578.e1-2.
11. **Topic I**, Ikic M, Ivcevic S, Kovacic N, Marusic A, Kusec R, Grcevic D. Leuk Res. 2013;37:705-12. Bone morphogenetic proteins regulate differentiation of human promyelocytic leukemia cells.
12. Carić T, Bilić M, Bilić LK, Prgomet D, Kovacić J, **Grahovac IT**, Hutinec Z. Neuroendocrine tumors of larynx--two case reports and literature review. Coll Antropol. 2012 Nov;36 Suppl 2:173-8.
13. Bilić M, Prgomet D, Kovac L, **Topić I**, Katić V. Nonepidermoid carcinomas of the larynx-15 years experience in the single institution. Lijec Vjesn. 2009;131:196-8.
14. Bilić M, Kovac L, **Topić I**. Lymphangioma in children. Lijec Vjesn. 2008;130(11-12):319-20.
15. Locally invasive papillary thyroid cancer-our experience. Prgomet D, Bilić M, Kovac L, Hutinec Z, **Topić I**. Lijec Vjesn. 2012;134:266-70.