Uloga putova Notch i PARP u limfocitima

Horvat, Luka

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:371369

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Luka Horvat

ULOGA PUTOVA NOTCH I PARP U LIMFOCITIMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Luka Horvat

ROLE OF NOTCH AND PARP PATHWAYS IN LYMPHOCYTES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Doktorski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost "Notch in hematopoietic stem cell differentiation and leukemia development″, IP-2013-11-7140 čiji je voditelj dr. sc. Mariastefania Antica, zn. savjetnik Instituta Ruđer Bošković, te s njim povezanim projektom "Razvoj karijera mladih istraživača" voditeljice izv. prof. dr. sc. Maje Matulić. Rad je također sufinancirala Potpora Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Prvo se želim zahvaliti svojoj mentorici Maji Matulić.

Hvala i prof. Mariastefaniji Antici i Josipi Skelin za veliku pomoć s protočnom citometrijom.

Zahvalio bih se i profesoru J.C. Zuniga-Pflücker (Odjel za imunologiju, Sveučilište u Torontu, Kanada) za njegov velikodušan dar transfeciranih stanica OP9 i OP9-DL1 korištenih u eksperimentima.

Zahvaljujem i članovima Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada, izv. prof. dr. sc. Petri Korać, doc. dr. sc. Ingi Marjanović i doc. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na ukazanoj susretljivosti, detaljnom čitanju disertacije i pruženim savjetima.

Hvala i mojim roditeljima, braći, te svim dragim prijateljima, bez kojih ne bih bio tu gdje jesam.

Na kraju posebno hvala mojoj strpljivoj i brižnoj supruzi Lei bez čije potpore ništa ne bi bilo isto.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

Uloga putova Notch i PARP u limfocitima

Luka Horvat
Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Diferencijacija krvnih stanica jedan je od najsloženijih procesa u organizmu. Regulirana djelovanjem transkripcijskih faktora u vremenu i prostoru, stvara specifičnu signalnu mrežu. Ova mreža karakteristična je za svaku vrstu krvnih stanica i diferencijacijsku fazu. Jedan od signalnih putova koji reguliraju diferencijaciju je put Notch. Cilj ovog istraživanja je istraživanje uloge puta Notch te njegova povezanost s putovima enzima poliADPribolizacijskom polimerazom (PARP) u limfocitima. PARP je enzim koji sudjeluje u posttranslacijskoj modifikaciji proteina, ima širok spektar djelovanja, sudjeluje u interakcijama s različitim elementima signalnih putova, modifikacijama transkripcijskih faktora i regulacijom strukture kromatina može utjecati na ekspresiju gena, a tako i na regulaciju signalnih putova. U ovom istraživanju napravljena je analiza ekspresije mreže gena povezanih s putovima Notch i PARP kod nekoliko leukemijskih staničnih linija limfocita, kao i promjene u njihovoj ekspresiji nakon modulacije aktivnosti ovih putova. Inhibicija PARP-a uzrokovala je promjene u ekspresiji liganda *JAGGED1* dok je inhibicija puta Notch utjecala na ekspresiju transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros (*IKFZ1* i *IKFZ3*), bez obzira na signalnu aktivnost puta Notch, ali ovisno o tipu limfocita. Također je uspostavljena metoda direktne i brze analize ekspresije iz malog broja stanica.
(101 stranicu, 34 slike, 1 tablica, 188 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: Notch, PARP, limfociti, leukemija
Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Petra Korać, doc. dr. sc. Inga Marjanović,
prof. dr. sc. Mariastefania Antica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Role of Notch and PARP pathways in lymphocytes

Luka Horvat
Faculty of Science, Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb, Croatia

The differentiation of blood cells is one of the most complex processes in the organism. Regulated by the activity of transcription factors in time and space, it creates a specific signaling network. This network is characteristic for each type of blood cells and their differentiation stage. One of the signaling pathways that regulate the differentiation is Notch. The aim of this research is to explore the role of the Notch pathway and its relations to the enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in lymphocytes. PARP is an enzyme that participates in posttranslational protein modification and has a wide spectrum of activities. It can affect gene expression and signaling pathways through transcription factor modification and interference with their activities, as well as induce changes in chromatin structure. In this study, we analyzed the expression of a set of genes involved in the Notch and PARP signaling in several leukemic cell lines and studied changes in their expression after modulation of activity of these pathways. PARP inhibition caused changes in *JAGGED1* ligand expression while inhibition of the Notch pathway influenced the expression of transcription factors from the Ikaros family (IKFZ1 and IKFZ3), regardless of signal path activity, but depending on the type of lymphocyte. A direct and rapid expression analysis for samples of limited size was also established.
(101 pages, 34 figures, 1 table, 188 references, original in Croatian)

Keywords: Notch, PARP, lymphocytes, leukemia
Supervisor: assoc. prof. Maja Matulić
Reviewers: assoc. prof. Petra Korać, asst. prof. Inga Marjanović,
prof. Mariastefania Antica

Sadržaj

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Hematopoetski sustav 3
2.2. Razvoj i diferencijacija limfocita 4
2.2.1. Limfociti T 5
2.2.2. Limfociti B 7
2.3. Poremećaji razvoja i diferencijacije limfocita 9
2.4. Signalni put Notch 10
2.5. Poli(ADP)-ribolizacijska polimeraza (PARP) 17
3. MATERIJALI I METODE 21
3.1. Stanična kultura 21
3.2. Kokultura staničnih linija OP9-DL1 i 697 21
3.3. Tretiranje stanica proteinom DLL1 21
3.4. Određivanje krivulje rasta i vijabilnosti 22
3.5. Umnažanje plazmida 22
3.6. Kloniranje plazmida 23
3.7. Transfekcija stanica u suspenziji 24
3.8. Izolacija genomske DNA 24
3.9. Izolacija RNA i reverzna transkripcija 24
3.10. Lančana reakcija polimerazom i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 25
3.11. Dizajn početnica 26
3.12. Višestruka lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 27
3.13. Izolacija DNA iz agaroznog gela 28
3.14. Protočna citometrija 29
3.15. Izolacija staničnih proteina i određivanje njihove koncentracije prema metodi Bradford 29
3.16. Westernska metoda otiska 30
3.16.1 Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu 30
3.16.2. Prijenos proteina na membranu 30
3.17. Statistička obrada podataka 32
4. REZULTATI 33

4.1. Karakterizacija staničnih linija 33
4.2. Višestruka analiza ekspresije RNA iz malog broja stanica 35
4.3. Analiza ekspresije proteina 38
4.4. Inhibicija puteva Notch i PARP 39
4.4.1. Analiza ekspresije gena u staničnim linijama nakon inhibicije putova Notch i PARP 42
4.4.2. Analiza ekspresije proteina u staničnim linijama nakon inhibicije putova Notch i PARP 45
4.4.3. Analiza puta kinaze glikogen sintaze 46
4.5. Inhibicija kazein kinaze II 47
4.6. Istraživanje utjecaja povećanja aktivnosti puta Notch i ekspresije PARP na biologiju stanica leukemije 50
4.6.1. Analiza utjecaja povećanja ekspresije gena YY1 na signalne putove Notch i PARP 50
4.6.2. Analiza utjecaja povećanja ekspresije gena YY1 na signalne putove Notch i PARP 52
4.6.3. Analiza utjecaja unosa plazmida sa slijedom nukleotida koji kodira za protein NICD na leukemijske stanične linije 54
4.7. Aktivacija puta Notch ekstracelularnim ligandom 55
4.7.1.Djelovanje proteina DLL1 na signalizaciju 55
4.7.2. Analiza aktivacije puta Notch uzgojem limfocita u kokulturi sa stanicama koje eksprimiraju ligande 57
5. RASPRAVA 62
6. ZAKLJUČCI 77
POPIS LITERATURE 78
PRILOZI 94
ŽIVOTOPIS 100

1. UVOD

Diferencijacija krvnih stanica jedan je od najsloženijih procesa u organizmu. Regulirana je djelovanjem transkripcijskih faktora u vremenu i prostoru te stvara specifičnu signalnu mrežu. Ova mreža karakteristična je za svaku vrstu krvnih stanica i diferencijacijsku fazu. Jedan od signalnih putova koji reguliraju diferencijaciju je put Notch (Artavanis-Tsakonas *i sur.*, 1999). Uključen je u razvojne procese u mnogim tkivima, od tkiva kukaca do sisavaca, a njegovi učinci jedinstveni su za tip stanica, čak i između srodnih vrsta hematopoetskih stanica (Somasundaram *i sur.*, 2015). Široki spektar ciljanih gena puta Notch posljedica je njegove suradnje s drugim signalnim putovima i aktivacije ekspresije gena u ovisnosti o kromatinskom statusu promotora i sukladno tome trenutačnom staničnom programu (Wang *i sur.*, 2014).

Za aktivaciju puta Notch potrebna je interakcija receptora s odgovarajućim ligandom eksprimiranim na susjednoj stanici. Mehanizmi koji vode različitim ishodima signalizacije kao posljedica različitih kombinacija receptora i liganda još uvijek nisu do kraja objašnjeni (Andersson *i sur.*, 2011). Postoji mnogo različitih molekula koje utječu na ishod signalizacije. Povratne petlje reguliraju npr. trajanje signalizacije, a moguće imaju ulogu i u uspostavljanju specifičnosti odgovora. Set gena aktiviranih signalnim putem Notch različit je u različitim staničnim tipovima.

U hematopoetskom sustavu signalizacija putem Notch jedan je od glavnih regulatora razvoja limfocita. Odgovoran je za usmjeravanje hematopoetskih multipotentnih prekusorskih stanica prema razvoju limfocita T (Taghon *i sur.*, 2005). Uključen je također u nekoliko procesa bitnih u sazrijevanju limfocita T u timusu i diferencijaciji perifernih limfocita T (Koyanagi *i sur.*, 2012). S druge strane, iako u ranoj limfopoezi blokira usmjeravanje prema limfocitima B, specifično signaliziranje Notch ima ulogu u specifikaciji B-staničnih podskupina u slezeni. Mutacije receptora Notch ili kromosomske translokacije koje dovode do aktivacije puta vidljive su u gotovo 60 % osoba koje boluju od akutne leukemije limfocita T (T-ALL) (Breit *i sur.*, 2006; Mirandola *i sur.*, 2011). Uloga signalnog puta Notch u razvoju leukemija limfocita B manje je jasna. Aktivacija Notcha u nekim tipovima akutne leukemije limfocita B (B-ALL) može dovesti do apoptoze i zaustavljanja rasta, dok u kroničnoj limfocitnoj leukemiji (CLL, od eng. chronic lymphocytic leukemia) i nekoliko tipova limfoma njegova mutacija i naknadna aktivacija može dovesti do pojave agresivnijih oblika bolesti (Fabbri *i sur.*, 2011; Hernandez Tejada *i sur.*, 2014;

Tohda *i sur.*, 2005). Akumulacija podataka o signalnom putu Notch i njegovoj važnosti u razvoju leukemija dovela je i do prvih kliničkih ispitivanja u kojima su se koristili njegovi inhibitori za liječenje T-ALL-a (Andersson and Lendahl, 2014). Signalni put Notch, iako sastavljen od relativno malog broja članova s osnovnim funkcijama, može biti moduliran molekulama koje djeluju kao inhibitori, kompetitori ili na druge načine utječu na njegove ključne molekule. Nedavno je pokazano da enzim poliADP-ribolizacijska polimeraza (PARP) također ima ulogu u regulaciji ovog puta (Kannan *i sur.*, 2011).

PARP je enzim koji sudjeluje u procesima poliADPribolizacije, posttranslacijske modifikacije proteina u stanici. PARP, u slučaju oštećenja DNA, mijenja strukturu kromatina i omogućava popravak, a uključen je u procese apoptoze i nekroze (Kim *i sur.*, 2004; Krishnakumar i Kraus, 2010; Morales *i sur.*, 2014). S druge strane, PARP ima ulogu u regulaciji transkripcije preko modulacije transkripcijskih faktora te sudjeluje u procesima diferencijacije. U hematopoetskom sustavu potiče procese upale kroz regulaciju upalnih transkripcijskih faktora, a nađena je njegova uloga i kod rekombinacije DNA tijekom diferencijacije limfocita T i B (Rosado *i sur.*, 2013).

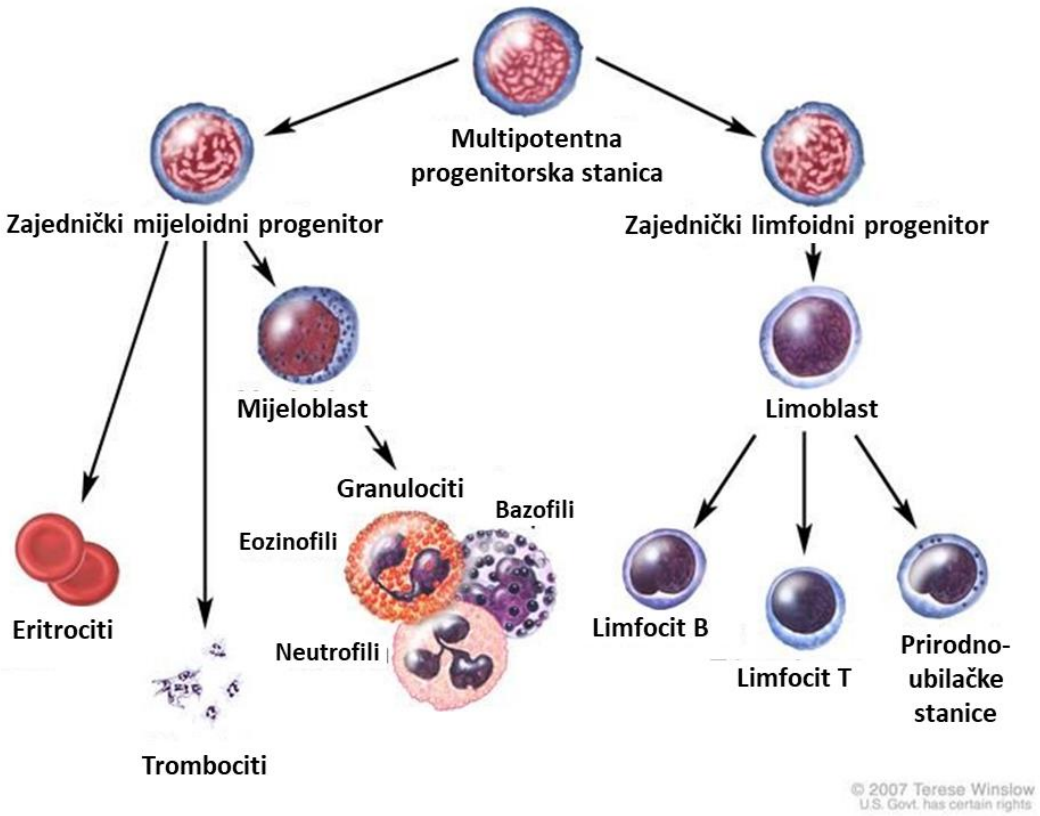
Hipoteza ovog istraživanja je da enzim PARP1 modulira put Notch kod pojedinih tipova limfocitnih stanica. Cilj ovog istraživanja je analizirati ulogu signalnog puta Notch i enzima PARP1 u limfocitima. Pronalazak veze između ta dva puta zahtijevao je analizu ekspresije i aktivnosti puta Notch u različitim staničnim linijama proizašlih iz leukemija limfocita T i B, te određivanje koje su specifične molekule uključene u put Notch karakteristične za pojedini tip limfocitnih stanica. Modulacijom putova Notch i PARP specifičnim inhibitorima i aktivatorima analizirane su promjene u ekspresiji na razini gena i proteina, rastu i preživljenju. Također, optimizirana je metoda direktne analize ekspresije iz malog broja stanica, kao polog za buduće istraživanje na primarnim stanicama.

Saznanja iz ovog istraživanja mogla bi pripomoći boljem razumijevanju biologije leukemija, a kroz njega i liječenju.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Hematopoetski sustav

Hematopoetski sustav u organizmu ima važnu ulogu jer krv, sastavljena od seruma i stanica, cirkulacijom opskrbljuje kisikom sve stanice, ima ulogu u obrani organizma, prijenosu hranjivih tvari i odnošenju štetnih produkata metabolizma. Krvne stanice, uključujući stanice imunosnog sustava, potječu od samoobnavljajuće pluripotentne hematopoetske matične stanice koje nalazimo u koštanoj srži (Slika 1.) (Spangrude *i sur.*, 1988). Diobom nastala stanica kćer može imati svojstva matične stanice, ili pak nastaje stanica koja se diferencira u specijaliziranu stanicu. Ovi procesi su regulirani unutarstaničnim i okolišnim čimbenicima. Diobom hematopoetske matične stanice koštane srži nastaju multipotentne progenitorske stanice koje daljnom diobom diferenciraju u zajedničke mijeloidne progenitore (CMP od eng. *common myeloid progenitors*) i zajedničke limfoidne progenitore (CLP od eng. *common lymphoid progenitors*) (Antica *i sur.*, 1994; Kondo *i sur.*, 1997). Proces hematopoeze odvija se neprestano, a započinje tijekom embrionalnog razvoja. Hematopoetski sustav održava se klonalnom proliferacijom kojom nastaju tri funkcionalno različita tipa stanica: matične stanice, stanicae progenitora i zrele krvne stanice. Matične stanice imaju veliku sposobnost samoobnavljanja i diferenciraju se u različite progenitorske stanice. Progenitorske stanice nemaju sposobnost samoobnavljanja, a njihovom diferencijacijom nastaju svi tipovi zrelih krvnih stanica (eritrociti, granulociti, monociti, megakariociti i limfociti). U međusinusnom prostoru koštane srži stromalne stanice, zajedno sa stanicama hematopoetskog podrijetla (npr. makrofazima), stvaraju mikrookoliš u kojem se odvija diferencijacija i sazrijevanje krvnih stanica posredstvom staničnih interakcija i faktora rasta (Despars *i sur.*, 2007; Patel *i sur.*, 2007). Stromalne stanice i stanice mikrookoliša koštane srži sintetiziraju različite čimbenike rasta (interleukine (IL), interferone (IFN), čimbenike stimulacije kolonija (CSF), transformirajuće čimbenike rasta (TGF), čimbenike tumorske nekroze (TNF)) koji djeluju aktivirajući ili inhibicijski na procese mijelo- i limfopoeze (Gabrilove and Jakubowski, 1990; di Giovine and Duff, 1990; Myoken *i sur.*, 1990). Ciljane hematopoetske stanice sadrže membranske receptore za određene čimbenike rasta koji posredstvom sekundarnih unutarstaničnih molekula induciraju proliferaciju, diferencijaciju i sazrijevanje stanica.



Slika 1. Razvoj krvnih stanica iz hematopoetske matične stanice.

Preuzeto i prilagođeno prema PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2002.

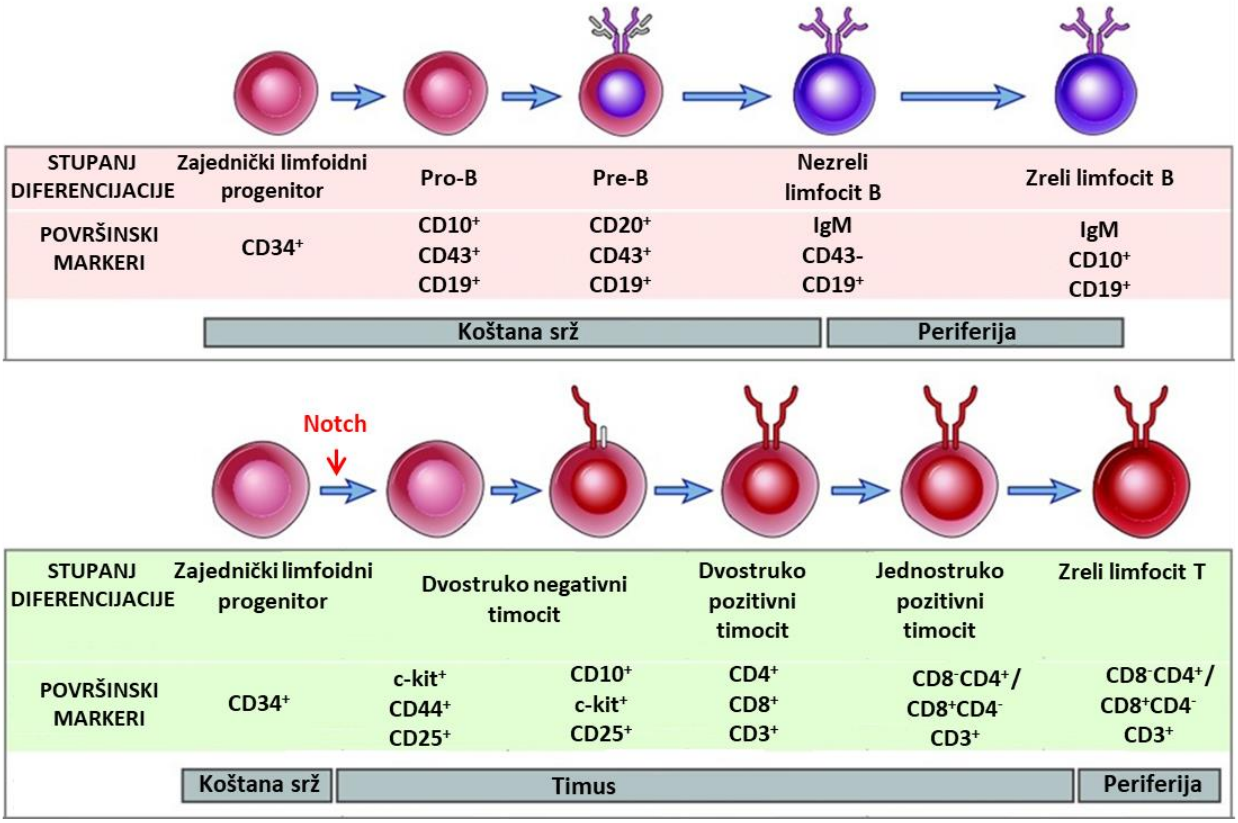
2.2. Razvoj i diferencijacija limfocita

Limfociti su najvažnije stanice imunosnog sustava, a naziv limfocit odnosi se na sve razvojne stadije limfocita. Nositelji su svih vrsta specifične (adaptivne) imunosti, a lučenjem limfokina aktiviraju ili pojačavaju mehanizme nespecifične (urođene) imunosti. Na temelju funkcije površinskih biljega razlikujemo tri populacije limfocita nastalih procesom limfopoeze: limfociti B, limfociti T i limfociti 0. Limfociti 0 ne posjeduju receptore limfocita T i B, a dijelimo ih na stanice ubojice (K-stanice od eng. *killer cell*) i stanice prirodne ubojice (NK-stanice od eng. *natural killer cell*). U primarnim limfatičkim organima nastaju u velikom broju (oko 10^9 stanica na dan), odlaze kroz krvotok do sekundarnih limfnih organa i tkiva, gdje sazrijevaju i poprimaju različite funkcije.

Limfociti sadrže brojne površinske molekule na temelju kojih možemo razlikovati njihove različite subpopulacije. Zbog toga je razvijena i posebna nomenklatura nazvana CD-klasifikacija (od eng. *cluster of differentiation*) zasnovana na prepoznavanju membranskih biljega specifičnim

antitijelima, kojih je danas poznato više od 200. Tako se može odrediti vrsta stanica diferencijacijski stupanj i razvojna faza, kao i stupanj aktivacije.

Sazrijevanje limfocita odigrava se u dvije faze. U prvoj dolazi do stvaranja zrelih imunokompetentnih stanica (primarna diferencijacija limfocita), a u drugoj, nakon susreta s antigenom, stanice diferenciraju u efektorske (izvršne) stanice imunosnog odgovora (sekundarna diferencijacija limfocita). Dva ključna procesa događaju se tijekom primarne diferencijacije: preuredba gena za antigenski receptor i izražaj receptora na membrani te odabir (selekcija) klonova limfocita koji su izrazili dobar receptor. U tom procesu stanice 'uče' razlikovati vlastito od tuđeg, a pri toj selekciji veliki broj stanica (npr. autoreaktivne, inertne) umire apoptozom (Andreis *i sur.*, 2010).



Slika 2. Prikaz sazrijevanja limfocita B i T.
Preuzeto i prilagođeno prema Abbas *i sur.*, 2012.

2.2.1. Limfociti T

Limfociti T su nositelji stanične imunosti. Sazrijevaju i diferenciraju se u timusu. Razlikujemo dvije populacije zrelih limfocita T, regulacijske (pomagačke i supresorske) i izvršne

(citotoksične). Osnovna je funkcija limfocita prepoznati antigene koje im predočuju druge stanice imunosnog sustava. Nakon prepoznavanja antigena, pomoću T-staničnog receptora (TCR, od eng. *T cell receptor*), aktivirani regulacijski limfociti luče citokine kojima potiču imunosni odgovor, dok citotoksične stanice izravno uništavaju stanicu s antigenima.

Nakon nastanka zajedničkog limfoidnog progenitora u koštanoj srži, razvoj limfocita T nastavlja se u timusu (Miller, 1961). Prastanice limfocita T ulaze u subkapsularno područje timusa pod utjecajem različitih kemotaktičkih signala i tu ih nazivamo timociti. Ove stanice ne sadrže obilježja limfocita T, već izražavaju membranske adhezijske molekule (CD34, CD44) i receptor za čimbenik rasta matičnih stanica (CD117). Receptor limfocita T sastoji se od idiotipskog (klonotipskog) receptora TCR (polimorfan i različit za klonove limfocita T), kompleksa glikoproteina CD3, te glikoproteina CD4/CD8. TCR je proteinski dimer, sastoji se od dva različita polipeptidna lanca, αβ ili γδ, koji su spojeni disulfidnom vezom. αβ TCR čine 90-95% populacije limfocita T. Kodirani su genima na dva različita lokusa. Svaki lokus se sastoji od nekoliko genskih segmenata koji se moraju pravilno organizirati kako bi stvorili aktivan i specifičan TCR. Segmenti se nazivaju V (od eng. *variable*), D (od eng. *diversity*), J (od eng. *joining*) i C (od eng. *constant genes*). Genski segmenti receptora limfocita T preuređuju se da bi formirali kompletni ekson varijabilne domene, a taj rearanžman lokusa za TCR odvija se tijekom sazrijevanja limfocita u timusu. Zahvaljujući tom procesu osigurava se varijabilnost prepoznavanja različitih antigena. Kako se radi o složenom procesu postoji niz kontrolnih točaka koje provjeravaju ispravnost i funkcionalnost nastalih produkata. Da bi timocit prošao kontrolnu točku zvanu β-selekcija, preuređen β lanac receptora TCR mora zadržati strukturna svojstva koja omogućuju njegovo prezentiranje na površini timocita s pre-TCRα. Time se eliminiraju timociti s velikim defektima uvedenim u TCR prilikom genskog preustroja. Sazrijevanjem stanica mijenja ekspresiju i drugih površinskih biljega. Stanice ulaze u timus kao dvostruko negativni timociti jer ne izražavaju biljege CD4 i CD8 (Slika 2.). Razvoj veće populacije limfocita T koji imaju TCR sastavljen od αβ lanaca, nastavlja se izražavanjem $CD4^+$ i $CD8^+$ biljega i u ovoj ih fazi nazivamo dvostruko pozitivnim timocitma. Ove stanice prolaze pozitivnu i negativnu selekciju koja dovodi do apoptoze stanica koje ne prepoznaju molekule MHC/HLA (od eng. *major histocompatibility complex / human leukocyte antigen*) u koje se antigeni uklapaju, kao i stanica koje na njih pojačano reagiraju. Na kraju ovog procesa opstaju jednostruko pozitivni timociti te izlaze iz timusa kao zrele stanice $CD4^+$ ili $CD8^+$ (za pregled vidi Janeway, 2005). γδ limfociti T ne

izražavaju koreceptorske molekule CD4 i CD8 i napuštaju timus bez procesa selekcije. Varijabilnost je njihovog receptora manja, prepoznaju antigene vezane za CD1, a ne za molekule MHC I te imaju ulogu intraepitelnih limfocita.

Nakon sazrijevanja u timusu zreli imunokompetentni limfociti T ulaze u krv, naseljavaju periferna limfna tkiva i recirkuliraju u potrazi za antigenom. Takvi limfociti nazivaju se naivnim ili djevičanskim limfocitima. Nakon dodira s antigenom dolazi do sekundarne diferencijacije limfocita T.

Temeljem različitih površinskih biljega razlikujemo nekoliko subpopulacija limfocita T. Pomagački limfociti (T_H, $CD4^+$) sudjeluju u sazrijevanju citotoksičnih limfocita i pomažu limfocitima B u proizvodnji antitijela. Prepoznaju antigen u sklopu molekule MHC/HLA razreda II (izražen na profesionalnim predočnim stanicama kao što su makrofazi, limfociti B i dendritske stanice). Ovisno o lučenju citokina pomagački limfociti T se dijele na T_H1 koje izlučuju IFN-γ, IL-2 i TNF-β, a zadaća im je razvoj stanične imunosti te T_H2 koji izlučuju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i potiču limfocite B na lučenje antitijela. Postoje i limfociti T_H17 koje luče IL-17 i IL-22 te dovode do razvoja lokalne upale privlačenjem granulocita.

Citotoksični limfociti T (Tc, CD8+) nastaju iz precitotoksičnih limfocita T nakon stimulacije antigenom. Prepoznaju peptide iz citosola u sklopu molekula MHC/HLA razreda I (molekule izražene na svim stanicama s jezgrom), a njihovo je glavno obilježje razaranje stanica bliskim kontaktom.

Regulacijski limfociti T (T_{reg}) lučenjem topivih molekula potiskuju imunosnu reakciju, posebno proizvodnju antitijela. Važni su u održavanju tolerancije, te sudjeluju u sprječavanju autoimunosti i neželjenih reakcija na tuđe antigene (npr. kod alergija).

2.2.2. Limfociti B

Limfociti B nositelji su humoralne imunosti. Ove stanice imaju na svojoj membrani receptore antigena (BCR, od eng. *B cell receptor*), molekule imunoglobulina (Ig), koje, kada dođu u doticaj s antigenom, aktiviraju niz procesa unutar stanice i rezultiraju proizvodnjom specifičnog antitijela. Većina ljudskih limfocita B nosi membranski IgM i IgD, a manjina imunoglobuline preostalih razreda (IgG, IgA, IgE). Kao signalna molekula BCR služi heterodimerna molekula sastavljena od dva polipeptidna lanca Ig-α i Ig-β (CD79α i CD79β), te tako tvori B-stanični receptorski kompleks. U citoplazmatskom dijelu prisutna je domena ITAM (od eng.

immunoreceptor tyrosine-based activation motif) odgovorna za pokretanje signala. Na površini limfocita B nalaze se i brojne druge molekule poput molekula MHC II, receptori za komponente komplementa, receptori za Fc-fragment imunoglobulina G, koreceptorske molekule i mnogi drugi biljezi (npr. CD19, CD21, CD81).

Sazrijevanje limfocita B odvija se u primarnim (neovisno o antigenu) i sekundarnim organima (ovisno o antigenu i suradnji s limfocitima T) imunosnog sustava. Tijekom sazrijevanja možemo razlikovati sedam stadija sazrijevanja limfocita B: limfociti pro-B, limfociti pre-B, nezreli, zreli, usmjereni, memorijski limfociti B i plazma-stanice (Burrows *i sur.*, 1991).

Limfociti B započinju razvoj u koštanoj srži gdje praroditeljska stanica počinje preslagivati gene V, J, D za teški lanac (μ) IgM te nastaje limfocit pro-B. U sljedećem stadiju razvija se limfocit pre-B s presloženim genima za laki lanac imunoglobulina i sintetizira teški lanac μ. Nakon sinteze lakih lanaca (κ i λ) na površini se eksprimiraju kompletne monomerne molekule IgM, tako nastaje nezreli limfocit B. Daljnje sazrijevanje odvija se u perifernim limfatičkim organima. Najprije dolazi do pojave molekule IgD, a pod utjecajem limfocita T i njihovih citokina zbiva se tzv. gensko prekapčanje te se na površini izražavaju i drugi razredi imunoglobulina umjesto IgM. Limfociti prelaze u limfoblaste, te prolaze niz diferencijacijskih dioba dajući plazma stanice ili memorijske stanice. Plazma stanice ne izražavaju površinske imunoglobuline, ali izlučuju antitijela, dok memorijske stanice izražavaju povećanu gustoću Ig receptora.

Molekulu antitijela čine dva teška i dva laka polipeptidna lanca. Pripadnost određenom razredu ovisi o vrsti teških lanaca (α, γ, δ, μ, ε) u molekuli imunoglobulina. Trodimenzionalno molekula imunoglobulina ima oblik slova Y. Lanci su međusobno povezani disulfidnim mostovima u osnovnu četveročlanu jedinicu. Antitijelo se sastoji od dva funkcionalno i topološki različta dijela. Jedan dio antitijela, domena Fab, obavlja funkciju prepoznavanja epitopa na antigenu, a drugi, domena Fc ima efektorsku funkciju, aktivira obrambene mehanizme i određuje biološka svojstva.

Razvoj limfocita B odnosi se na najbrojniju skupinu nazvanu limfociti B2 koji su nositelji humoralne adaptivne imunosti. Druga subpopulacija limfocita B1 (5-10 %) izražava biljeg $CD5^+$, imaju sposobnost samoobnove, ograničenu varijabilnost antigenskog receptora, izražavaju samo IgM i ne stvaraju memorijske stanice. Limfocite B1 zovemo i prirodna antitijela, a nositelji su urođene imunosti u pleuralnoj šupljini.

2.3. Poremećaji razvoja i diferencijacije limfocita

Leukemije i limfomi tumori su hematopoetskog i limfnog tkiva. Leukemije su zloćudne bolesti koje nastaju bujanjem krvnih stanica. Osim u krvi, nakupljanje može nastati i u drugim dijelovima limfnog sustava. S obzirom na više vrsta limfocita, i leukemije predstavljaju skupinu bolesti, a ne jednu izoliranu bolest. Također, leukemije se mogu razlikovati po tijeku bolesti. Neke se razvijaju brzo i agresivno, ugrožavajući život bolesnika, a druge sporije. Leukemija može biti akutna ili kronična. U akutnoj leukemiji stanice brzo proliferiraju. Kronična je leukemija češća i broj stanica raste sporije u početnim fazama. Limfoidne se leukemije također dijele prema stopi rasta i podrijetlu stanica na akutnu limfocitnu leukemiju (ALL) i kroničnu limfocitnu leukemiju (CLL). Limfomi, za razliku od leukemija, pripadaju kategoriji solidnih tumora, tj. ograničeni su na tkivo, obično limfne čvorove. Vrsta limfoma temelji se na podrijetlu stanica tumora. Neki tipovi bolesti počinju u limfnom sustavu, dok drugi u stanicama u krvi.

Neoplazme limfocita B i limfocita T/NK klonalni su tumori zrelih i nezrelih stanica u različitim fazama diferencijacije. Kako potječu od normalnih limfocita, u određenoj se mjeri mogu klasificirati prema odgovarajućoj normalnoj fazi diferencijacije (Swerdlow *i sur.*, 2017). Postoje međutim neke neoplazme limfocita B koje ne odgovaraju jasno normalnom stadiju diferencijacije. U zadnje vrijeme je pokazano da neke neoplazme pokazuju veliku heterogenost ili čak plastičnost (Macon *i sur.*, 2001). Zbog tih razloga nemoguće je napraviti klasifikaciju samo na temelju sličnosti normalnim diferencijacijskim stadijima stanica. Klasifikacija limfoidnih neoplazmi temelji se na svim raspoloživim podacima dobivenim od oboljelih osoba (Harris *i sur.*, 1994). Morfologija i imunofenotipizacija uglavnom su dovoljne za klasifikaciju većeg broja limfoidnih neoplazmi, iako treba imati na umu da nijedan zasebni antigenski biljeg nije specifičan za samo jedan tip neoplazme. Za točnu dijagnozu potrebno je napraviti kombinaciju morfoloških obilježja i antigenskih biljega. Ulogu u klasifikaciji imaju i genetička obilježja poput detekcije kromosomskih aberacija i genskih mutacija, te ekspresije pojedinih gena. Analize lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i fluorescencijska hibridizacija *in situ* (FISH), dragocjeni dijagnostički alati za ispitivanje klonalnosti kod B- i T-neoplazmi, te identifikaciju translokacija povezanih s nekim vrstama oboljenja. Limfoidna oboljenja variraju u kliničkoj slici, od indolentnih do agresivnih, a zahvaljujući klasifikaciji moguće je prognozirati i tijek bolesti.

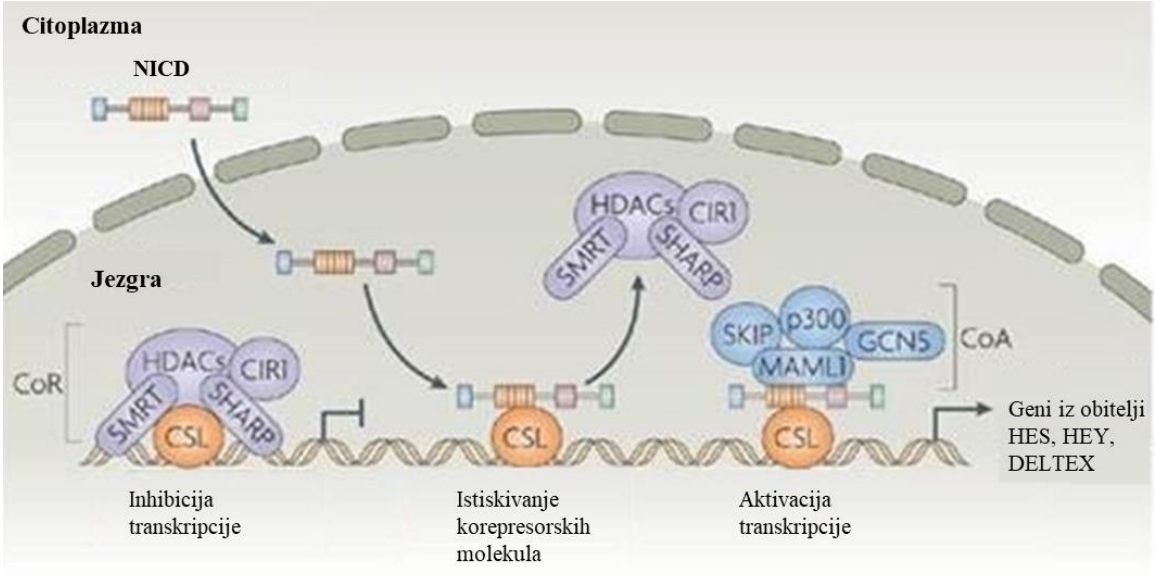
Imunofenotip i morfologija često se mijenjaju tijekom vremena, budući da limfoidna neoplazma prolazi klonalnu evoluciju uz stjecanje dodatnih genetskih promjena (Green *i sur.*, 2013).

Neoplazme limfoidnih prekursora primarno su bolesti djece (75 % slučajeva je u djece mlađe od 6 godina). U približno 85 % slučajeva limfoblastičnih leukemija riječ je o prekusorima limfocita B, dok su prekursori limfocita T češće prisutni u limfomima (Swerdlow *i sur.*, 2017).

Pokazalo se da infekcije patogenima mogu doprinijeti razvoju limfoma i leukemija. Tako je pokazano da prisustvo pojedinih virusa značajno korelira s razvojem limfoidnih neoplazmi (npr. prisutnost virusa T-limfocitne leukemije čovjeka i virusa Epstein-Barr). Osim patogena, i okolišni čimbenici povećavaju rizik razvoja B-staničnih limfoma, poput izloženosti pesticidima, herbicidima i nekim kacinogenima (Colt *i sur.*, 2006; Hartge *i sur.*, 2005).

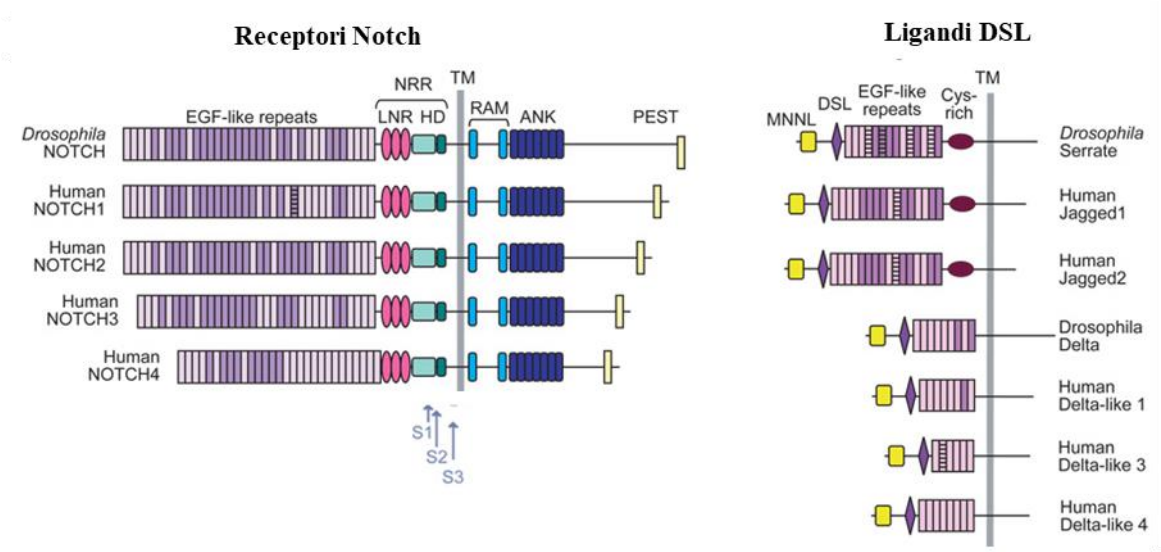
2.4. Signalni put Notch

Signalni put Notch prvotno je otkriven 1914. g. kada je John S. Dexter primijetio pojavu ureza (od eng. *notch*) na krilu vinske mušice *Drosophila melanogaster.* 1917. g. Thomas Hunt Morgan pronašao je alele gena odgovornog za taj fenomen, a 1985. g. opisan je homologni gen odgovoran za sintezu istoimenog proteina u ljudi (Wharton *i sur.*, 1985). Signalni put Notch jedan je od nekoliko signalnih putova koji ima bitnu ulogu u procesima diferencijacije u različitim tkivima. Jedan od poznatijih mehanizama djelovanja je lateralna inhibicija i indukcija (Sjöqvist i Andersson, 2017). Lateralna inhibicija događa se kada pojedina stanica koja započne diferencijaciju signalizira svojim susjedinim stanicama da ne učine isto. Ovaj inhibitorni signal ovisan o međusobnom kontaktu stanica posredovan je ligandom na površini diferencirane stanice koji se veže na receptor Notch eksprimiran na susjednim stanicama. Osobitost je kanonskog puta Notch nedostatak amplifikacije tijekom transdukcije signala, što je suprotno većini drugih putova koji imaju integrirane korake amplifikacije signala, na primjer u obliku fosforilacije jednog ili više proteina uključenih u put (Andersson *i sur.*, 2011). Signalni put Notch vrlo je osjetljiv na devijaciju u 'količini gena', a haploidne i jedinke s prisutnom dodatnom kopijom gena receptora Notch ili nekog od njegovih liganda mogu imati različite poremećaje (Krebs *i sur.*, 2004; McDaniell *i sur.*, 2006).



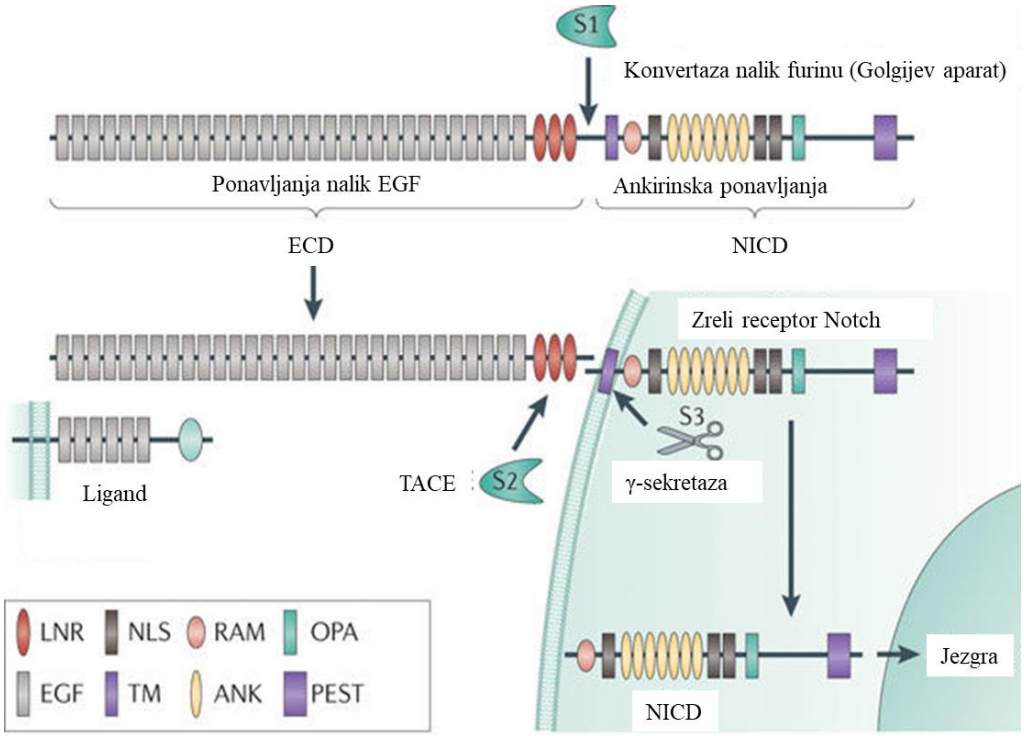
Slika 3. Kanonska signalizacija putem molekule Notch. Preuzeto i prilagođeno prema Osborne *i* Minter, 2007.

Aktivacija signaliziranja u putu Notch započinje interakcijom transmembranskog receptora s izvanstaničnim transmembranskim ligandom na susjednoj stanici, što izaziva proteolitičko cijepanje receptora. Tako dolazi do oslobađanja intracelularne domene receptora Notch (NICD). NICD se translocira u jezgru, veže s molekulom CBF1 (RBPJ-κ) / Suppressor of Hairless / LAG-1 (CSL) te vezanjem kompleksa za specifičnu sekvencu DNA inicira transkripciju ciljanih gena ovog puta (Slika 3.). Ne-kanonski signalizacijski put razlikuje se od kanonskog u tome što se može inicirati vezanjem nekog drugog liganda ili ne zahtijeva cijepanje receptora Notch (D'Souza *i sur.*, 2010). Osim osnovnih molekula signalnog puta Notch, pokazalo se da mnogo drugih proteina utječe na signalizaciju u različitim fazama prijenosa signala. Tako na primjer neki proteini utječu na unutarstanični transport liganda, poput proteina Mind bomb (Mib) (Itoh *i sur.*, 2003) i Neuralized (Neur) (Yeh *i sur.*, 2001), dok drugi reguliraju vezanje NICD-a na CSL, poput proteina sličnih Mastermindu (MAML) (Jeffries *i sur.*, 2002). Osim toga, signaliziranje putem Notch ovisi i o aktivnosti drugih signalnih putova, kao što su Wnt, TGF-β, kinaza MAP ili PI3K (Guruharsha *i sur.*, 2012; Osborne *i* Minter, 2007).



Slika 4. Shematski prikaz organizacije domena receptora Notch i liganada Delta-Serrate-Lag (DSL). Preuzeto i prilagođeno prema Gordon *i sur.*, 2008.

Kod sisavaca postoje četiri tipa receptora Notch (Notch1-4) i pet kanonskih liganada (Slika 4.) za koje je karakteristično prisustvo domene Delta-Serrate-Lag (DSL) (Tax *i sur.*, 1994). Ovo generira velik broj kombinacija između različitih receptora i liganda, što bi potencijalno moglo dovesti do različitih staničnih odgovora (Andersson *i sur.*, 2011). Receptori iz porodice Notch evolucijski su konzervirani transmembranski proteini koji se sastoje od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Izvanstanična domena bitna je jer sadrži uzastopna ponavljanja slična epidermalnom faktoru rasta (EGF, od eng. *epidermal growth factor*) potrebna za vezivanje liganda (Rebay *i sur.*, 1991).

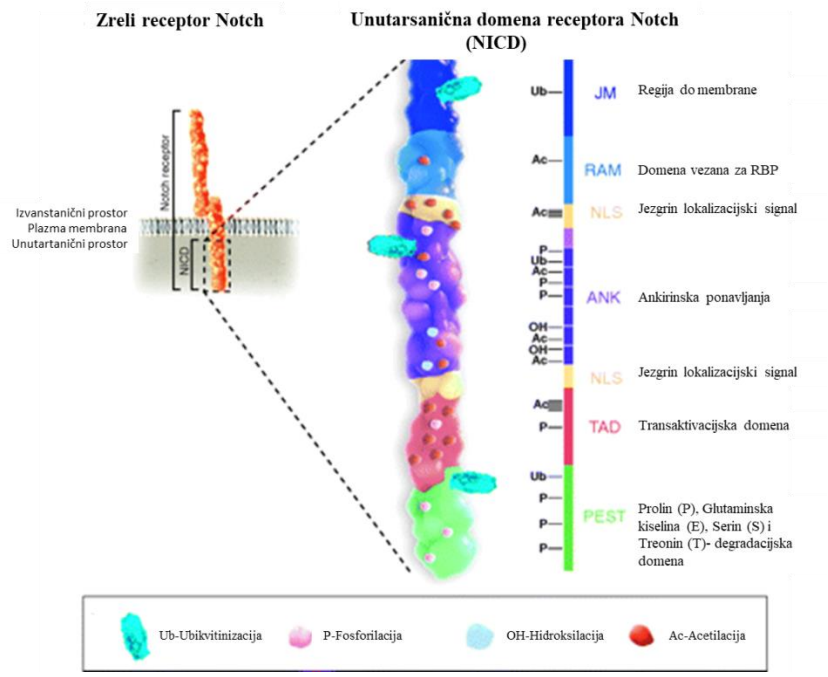


Slika 5. Strukturna organizacija i proteolitičko procesiranje Notch receptora.
LNR: ponavljanja bogata cisteinom LIN12; NLS: jezgrin lokalizacijski signal, RAM: domena asocirana s RBP-J; OPA: regija koja sadrži poliglutaminska ponavljanja; EGF: domena nalik epidermalnom faktoru rasta; TM: transmembranska domena; ANK: ponavljanja nalik ankirinu; PEST: prolin, glutaminska kiselina, serin, treonin , signal za degradaciju proteina. Preuzeto i prilagođeno prema Ranganathan *i sur.*, 2011.

Ekstracelularna domena receptora NOTCH1 sastoji se od 36 ponavljanja N-terminalnih regija EGF, praćenih negativnom regulatornom regijom (NRR) koja se sastoji od 3 ponavljanja regije Notch-Lin1 i heterodimerizacijske domene (HD). Za vrijeme transporta na površinu stanice protein NOTCH1 cijepa se proteazom nalik furinu na mjestu S1 u domeni HD (Slika 5.). Kao rezultat tog cijepanja zreli je receptor NOTCH1 heterodimer sastavljeni od nekovalentno povezane izvanstanične i transmembranske podjedinice. Prijenos signala započinje vezanjem receptora Notch za ligand eksprimiran na susjednoj stanici. Vezanje izaziva konformacijske promjene na receptoru te omogućava još dva cijepanja. Iduće cijepanje odvija se preferentno s metaloproteinazom ADAM10 na mjestu S2. Cijepanju na mjestu S2 prethodi endocitoza liganda kod susjedne stanice koja ga je eksprimirala. Tim cijepanjem stvara se kratko živući intermedijer

koji se zatim cijepa γ-seretazom na mjestu S3. To cijepanje oslobađa intracelularnu domenu receptora NOTCH1 i omogućava njezin put u jezgru kao molekule NICD1.

Kod sisavaca razlikujemo pet liganda DSL koji su ili slični molekuli Delta (Dll1, Dll2, Dll3; od eng. *Delta like ligand*) ili slični molekuli Serrate vinske mušice (Jagged1 i Jagged2). Unatoč sličnosti u ukupnoj modularnoj organizaciji izvanstaničnih domena (Slika 4.), postoje neke strukturne razlike između liganada DSL. Broj ponavljanja sličnih molekuli EGF može varirati, kao i razmak između motiva. Štoviše, ligandi slični molekuli Serrate (Jagged) imaju i regiju bogatu cisteinom i djelomične homologije s domenom von Willebrandovg faktora tipa C (VWFC) koja nije prisutna kod liganada sličnih Delti (Vitt *i sur.*, 2001). Intracelularna domena liganada DSL pokazuje najnižu razinu ukupne homologije. Većina, ali ne i svi ligandi DSL imaju C terminalni motiv PDZ koji omogućava interakciju s aktinskim citoskeletom i ima ulogu nezavisnu o signalizaciji putem Notch (Pintar *i sur.*, 2007). Ligand Dll3 strukturno je najrazličitiji ligand s degeneriranom domenom DSL i s više lizinskih ostataka (potencijalna mjesta za ubikvitinizaciju s E3 ubikvitin ligazama). Dll3 ne veže receptor Notch *in trans* i ne aktivira signalizaciju puta Notch, a funkcionira isključivo kao antagonist receptora Notch (Ladi *i sur.*, 2005). Za razliku od ostalih liganada većina liganda Dll3 nalazi se u Golgijevom aparatu, dok je na površini stanice jedva prisutan (Geffers *i sur.*, 2007). Razvojni procesi osjetljivi su na količinu receptora Notch i liganda, naglašavajući važnost razine ekspresije za normalno signaliziranje. U ljudi, mutacije i haploinsufijencije JAGGED1 ili NOTCH2 povezane su s Alagillovim sindromom (McDaniell *i sur.*, 2006), dok su haploinsuficijencije NOTCH1 uključene u podtip nasljedne bolesti aorte (Garg *i sur.*, 2005). Za razliku od *trans*-interakcije između Notch liganda i receptorske stanice koja dovodi do aktiviranja signalizacije, interakcija između Notch liganada i receptora izraženih u istoj stanici dovodi do inhibicije signalizacije kroz slabo definirani proces *cis*-interakcija (Glittenberg *i sur.*, 2006). Također, ovisno o vrsti liganda, tipu receptora i njihovom *cis* ili *trans* položaju, moguć je različiti odgovor signalizacije putem Notch (Sprinzak *i sur.*, 2010). Ligandi DSL prolaze kroz proteolitička cijepanja pomoću metaloproteinaza ADAM i γ-sekretaze slično kao i receptor Notch, međutim, za razliku od signalizacije inducirane cijepanjem receptora Notch, proteolitičko uklanjanje liganda s površine stanice može ili inhibirati ili pojačati signalizaciju puta Notch. Dok proteoliza receptora Notch generira intracelularni fragment koji djeluje kao prenosioc signala, proizvodi li cijepanje liganda u susjednoj stanici unutarstanične signale, još uvijek nije razjašnjeno (Zolkiewska, 2008).



Slika 6. Građa unutarstanične domene receptora Notch (NICD) i njene postranslacijske modifikacije. Preuzeto i prilagođeno prema Andersson *i sur.*, 2011.

Zanimljivo je da se relativna snaga interakcije receptor-ligand može modulirati post-translacijskim modifikacijama receptora Notch (Stanley *i* Okajima, 2010) (Slika 6.).

Velik je broj gena reguliranih kao nizvodne mete puta Notch, a najbolje opisane porodice su transkripcijski faktori strukture uzvojnica-petlja-uzvojnica poput *HES* (od eng. *Hairy enhancer of split*) i *HEY* (porodica srodna represorskom proteinu HES; HERP, od eng. *Hes-related repressor protein*). Nadalje, signalizacija putem Notch pozitivno je ili negativno regulirana raznim drugim proteinima poput Fringe, koji regulira proces fukozilacije, Mastermind, Wingless, NUMB, DELTEX i RUNX (Artavanis-Tsakonas *i sur.*, 1999). Iako je glavni protein za vezanje NICD-a CSL, put neovisan o CSL također je poznat (Weinmaster, 1997). NICD može vezati domenom ANK (od eng. *ankyrin repeats*) citoplazmatski protein s domenom cinkova prsta, DELTEX i tako ometati vezanje za CSL (Matsuno *i sur.*, 1998).

Signalizacija putem Notch ima važnu ulogu u diferencijaciji hematopoetskih stanica. Tako na primjer, CLP migriraju iz koštane srži u timus, gdje timusne epitelne stanice eksprimiraju DLL4 i pokreću signalizaciju putem receptora NOTCH. Ovaj signal je neophodan za razvoj limfocita T i potreban za rane faze diferencijacije timocita sve do nastanka dvostruko negativnih timocita

(Hozumi *i sur.*, 2008; Jaleco *i sur.*, 2001). Aktivno signaliziranje tijekom ovih ranih faza razvoja limfocita T inhibira razvoj drugih linija, kao što su limfociti B i mijeloidne stanice. Tijekom β-selekcije, Notch signalizacija se isključuje kao rezultat signala pre-T receptora stanice. Stoga kasnije faze razvoja limfocita T pokazuju vrlo nisku razinu Notch signalizacije. Kod CLP u koštanoj srži pravilan razvoj limfocita B omogućava neaktivnost puta Notch. Nakon migracije nezrelih limfocita B u slezenu, interakcija DLL1 s receptorom NOTCH2 usmjerava limfocite B u marginalne zone umjesto razvoja folikularnih limfocita B (Pillai and Cariappa, 2009). Pokazano je da signalizacija putem Notch ima ulogu i u razvoju dendritskih stanica, pomoćničkih limfocita T, Treg, ali i kod drugih krvnh stanica u pojedinim fazama razvoja i specifikacije (Radtke *i sur.*, 2013).

U skladu s važnom ulogom u mnogim vrstama stanica, mutacija gena Notch dovodi do bolesti u različitim organima i tkivima (jetra, kosti, srce, oko, koža, bubreg i vaskulatura) (Talora *i sur.*, 2008). Poremećaji povezani s putem Notch uključuju Alagilleov sindrom uzrokovan mutacijama liganda (JAG1) ili receptora (NOTCH2) i autosomalna recesivna spondilokostalna disostoza uzrokovana mutacijama u ligandu (DLL3), kao i u nekoliko drugih članova signalnog puta Notch. Mutacije receptora NOTCH2 također su nedavno povezane s Hajdu-Cheney sindromom. Mutacije u receptoru NOTCH1 povezane su s nekoliko tipova bolesti srca, a mutacije receptora NOTCH3 uzrokuju sindrom CADASIL (cerebralna autosomno dominantna arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom) (Penton *i sur.*, 2012).

Onkogeni potencijal signalizacije putem Notch pokazan je prvi put kod podskupine limfoblastičnih leukemija i limfoma limfocita T kod kojih je translokacija (7; 9) (q34; q34.3) dovela do nastanka konstitutivno aktivne molekule NICD (Ellisen *i sur.*, 1991). U kasnijim studijama je pokazano da manje od 1 % svih ljudskih leukemija limfocita T ili limfoma sadrži ovu translokaciju (Ma *i sur.*, 1999). Također su pokazani poremećaji u signalizaciji putem Notch u nekoliko humanih leukemija limfocita T i limfoma koji nisu imali genomska preustrojstva (Jundt *i sur.*, 2008), što znači da povećana aktivnost puta Notch može imati bitnu ulogu u ljudskoj leukemogenezi. Visoke razine ekspresije NOTCH3 dokazane su u uzorcima humanih akutnih leukemija limfocita T (T-ALL) (Bellavia *i sur.*, 2002). Mutacije NOTCH1 nisu povezane s razvojem B-ALL, a aktivirana signalizacija puta Notch moćan je induktor zaustavljanja rasta i apoptoze kod određenih tipova malignih limfocita B (Zweidler-McKay *i sur.*, 2005). Povećana

ekspresija NOTCH2 zapažena je kod malignih stanica bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom limfocita B (B-CLL), a povezana je s povećanim preživljavanjem limfocita B (Hubmann *i sur.*, 2002). Kod multiplog mijeloma i pojave malignosti plazma stanica, uz aktivaciju signalnog puta Notch jako je važna i interakcija s mikrookolišem gdje on igra važnu ulogu u diferencijaciji, migraciji, proliferaciji, preživljavanju i otpornosti na lijekove malignih plazma stanica (Kawano *i sur.*, 2015).

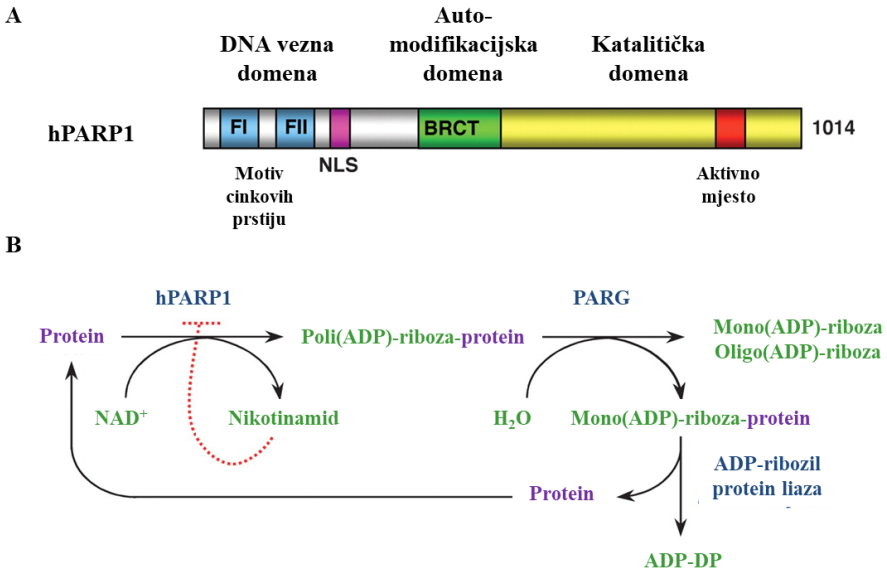
Može se zaključiti da poremećaji u aktivaciji puta Notch imaju drugačije uloge u različitim tumorima limfocita B, akutnim ili kroničnim, vjerojatno ovisno o stupnju diferencijacije limfocita B, na kojem se odvija glavni leukemogeni događaj (Matulic *i sur.*, 2015; Talora *i sur.*, 2008).

2.5. Poli(ADP)-ribolizacijska polimeraza (PARP)

Poli(ADP-riboza) polimeraza (PARP) enzim je koji katalizira nastanak nukleotidnih polimera, poliADP-ribozilaciju proteina. PARP je prvotno primijećen 80-ih godina kod oštećenih stanica kada je opisana njegova osnovna funkcija: aktivacija nakon jednolančanog/dvolančanog loma DNA. Takve promjene aktiviraju enzim, uzrokuju nastanak lanaca poliADP-riboze na kromatinu, što dovodi do smanjenja zbijenosti kromatina, a to omogućuje pristup enzimima popravka. PARP također omogućuje promjene na transkripcijskim faktorima koje imaju za cilj smanjenje transkripcije kako bi se omogućio popravak. U porodicu enzima PARP spada čak 17 proteina koji imaju homolognu katalitičku domenu (Amé *i sur.*, 2004). Svi članovi te porodice ne moraju imati iste domene, a čak ni parpilacijsku ulogu. Neki imaju i funkciju mono(ADP)-ribozil transferaze (Hottiger *i sur.*, 2010). Članovi porodice PARP lokalizirani su u različitim staničnim kompartimentima, uključujući jezgru, citoplazmu i mitohondrije, a subcelularna lokalizacija i funkcija mnogih tipova PARP-a je još nepoznata (Amé *i sur.*, 2004; Hassa and Hottiger, 2008). Većina nastalih lanaca poli(ADP)-riboze u stanici degradirana je enzimom poli(ADP)-riboza glikohidrolaza (PARG), koji ima aktivnosti egzo- i endo-glikozidaze (Cohen-Armon *i sur.*, 2007).

PARP1 je jedan od najznačajnih i najbolje opisanih proteina porodice poli(ADP-riboza) polimeraza. To je visoko konzervirani protein veličine od 116 kDa (D'Amours *i sur.*, 1999a), s modularnom strukturom od više neovisnih domena (Slika 7.). Glavne su funkcionalne domene enzima PARP1 amino-terminalna domena koja veže DNA (DBD), središnja domena za automodifikaciju (AMD) i karboksi-terminalna katalitička domena (CD) (Hakmé *i sur.*, 2008).

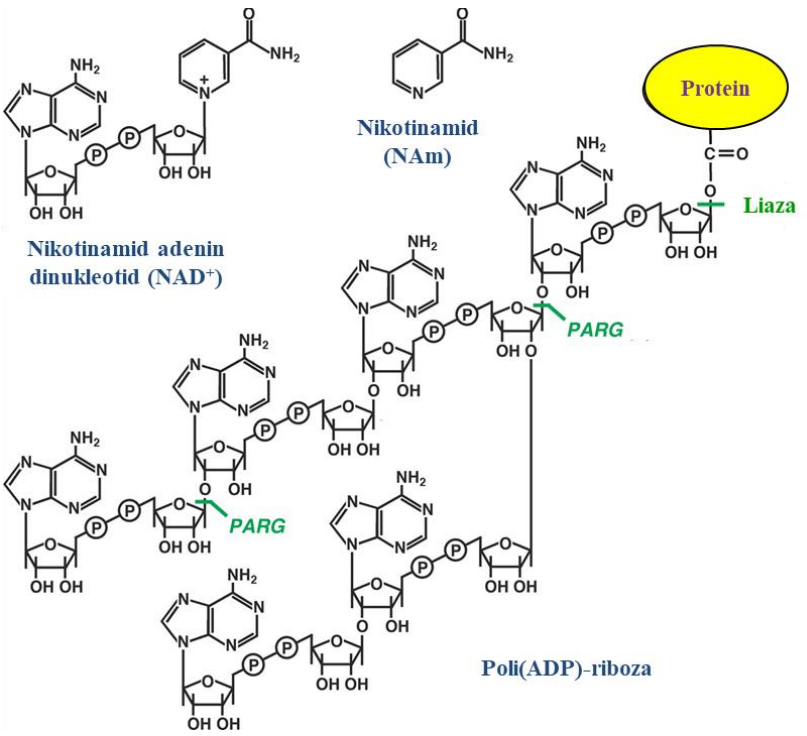
Također sadrži jezgrin lokalizirajući signal (NLS) i mjesto cijepanja kaspazom. Aktivnost PARP1 se povećava i do 100 puta u slučaju oštećenja DNA nastankom lomova i ima glavnu ulogu u popravku jednostrukog lančanog loma DNA procesima izrezivanja baze (BER) (Dantzer *i sur.*, 1999), a pokazana je i njegova uloga u popravku dvolančanih lomova (von Kobbe *i sur.*, 2003).



Slika 7. Domene poliADP-ribolizacijske polimeraze 1 (PARP1) (A) i proces sinteze i degradacije lanaca poli(ADP)-roboze na akceptorskom proteinu (B). Preuzeto i prilagođeno prema Kim *i sur.*, 2005

PARP1 ima važnu ulogu u regulaciji duljine telomera, a zajedno s ostalim članovima porodice PARP, PARP3, PARP4 i PARP5, prisutan je i u mitotskom aparatu i stoga može biti uključen u regulaciju razdvajanja kromosoma (Miwa *i sur.*, 2006). PARP1 može modificirati transkripcijske faktore i na taj način sudjelovati u regulaciji transkripcije. Vezivanjem na kromatin, PARP1 može promijeniti strukturu nukleosoma, kao i sastav te zbijenost kromatina. To se može dogoditi ciljanom promjenom proteina enzimskom aktivnošću PARP1, kao i kompeticijom za vezna mjesta na nukleosomima (Ju *i sur.*, 2006; Kim *i sur.*, 2004; Krishnakumar *i sur.*, 2008). Nedavna studija genomske lokalizacije pokazala je da je PARP1 vezan na promotore aktivno

transkribiranih gena (Krishnakumar *i sur.*, 2008). Također je pokazano kako PARP ima ulogu u regulaciji transkripcije pomoću RNA polimeraze II (Chen *i sur.*, 2018).



Slika 8. Kemijske strukture NAD^+, nikotinamida i lanca poli(ADP)-riboze (PAR).
PARG: poli (ADP)-riboza glikohidrolaza. Preuzeto i prilagođeno prema Kim *i sur.*, 2005.

Za razliku od uloge kao faktora preživljavanja u prisustvu niske razine oštećenja DNA, PARP1 potiče staničnu smrt kod opsežnog oštećenja DNA, oslobađajući faktor indukcije apoptoze (AIF) iz mitohondrija. Povećana parpilacija jezgrinih proteina prisutna je za vrijeme apoptoze (Boulares *i sur.*, 1999), nakon čega slijedi cijepanje PARP-a, katalizirano kaspazom-3. Ova inaktivacija PARP-a vjerojatno je nužna kako bi se spriječilo iscrpljivanje NAD-a (supstrata PARP-a) i ATP-a, budući da je je apoptoza proces koji zahtijeva mnogo ATP. U slučaju nedostatka energije stanica ide u nekrozu (Fatokun *i sur.*, 2014)

PARP1 je krajnja točka brojnih staničnih signalnih putova, uključujući i one regulirane hormonima, stresom i oštećenjima DNA (Madunić *i sur.*, 2016). PARP1 je podložan različitim posttranslacijskim modifikacijama koje igraju ključnu ulogu u reguliranju njegove aktivnosti i stvaranju specifičnosti krajnje signalizacije (Krishnakumar *i* Kraus, 2010). To uključuje

parpilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ubikvitinizaciju i sumolizaciju (Cohen-Armon *i sur.*, 2007; D'Amours *i sur.*, 1999b; Martin *i sur.*, 2009). PARP igra važnu ulogu prilikom sazrijevanja limfocita, sprječavanjem aktivacije apoptskog odgovora ovisnog o oštećenju DNA tijekom višestrukih krugova preuređivanja DNA (Rosado *i sur.*, 2013; Stępnik *i sur.*, 2017), kao i kod prekapčanja imunogobulinskih razreda (Paddock *i sur.*, 2010; Robert *i sur.*, 2009).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Stanična kultura

U istraživanju su korištene komercijalno dostupne stanične linije različitih tipova leukemija B- i limfocita T: Jurkat (ACC 282; akutna leukemija limfocita T), 697 (ACC 42; akutna limfoblastična leukemija prekursora limfocita B) CLL (ACC 773; kronična leukemija limfocita B) i Nalm6 (ACC 128; akutna limfoblastična leukemija prekursora limfocita B) (DSMZ (od njem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Stanice su uzgajane u mediju RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) s dodatkom 10 % fetalnog goveđeg seruma (Sigma-Aldrich) pri 37 ºC uz 5 % CO_2 i vlagu. Stanice su periodično testirane na prisustvo mikoplazmi kompletom EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological Industries, Beit Haemek, Izrael).

3.2. Kokultura staničnih linija OP9-DL1 i 697

Stanice 697 uzgajane su u kokulturi sa stanicama hranilicama linije OP9. Ova je linija izvedena iz žrtvovanih novorođenih miševa soja B6C3F1. Stanice su transducirane retrovirusnim vektorom MigR1 za ekspresiju proteina DLL1 (Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002). Stanice OP9-DL1 i OP9-GFP su dar profesora J.C. Zuniga-Pflücker (Odjel za imunologiju, Sveučilište u Torontu, Kanada), a institucija koja je potpisnik ugovora o prijenosu materijala je Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre. 10^5 stanica OP9-DL1 nasađeno je početnog (nultog) dana pokusa po svakoj Petrijevoj zdjelici promjera 35 mm. Nakon inkubacije stanica OP9 te perioda priljepljivanja stanica (inkubacija u trajanju 6 do 18 sati) adheriranim stanicama promijenjen je medij, a kulturi dodano 10^5 stanica linije 697 u 2 ml medija za uzgoj OP9 stanica (DMEM). Stanice su uzgajane u kokulturi kroz 7 dana, nakon čega su sortirane pomoću protočnog citometra (SONY SH800).

3.3. Tretiranje stanica proteinom DLL1

Rekombinantni protein DLL1 (Enzo Life Sciences, New York, SAD) otopljen je u 0,1 % BSA u koncentraciji od 40 µg/ml. 0,2 % želatina otopljena je u vodi. Autoklavirana i ohlađena na 37°C, želatina je pomiješana s otopinom proteina DLL1 tako da je završna koncentracija bila 1 µg/ml (Lee *i sur.*, 2013; Tsao *i sur.*, 2011). 250 µl takve smjese stavljeno je na petrijevku promjera 35

mm i ostavljeno 1,5 h na + 4° C. Kod tretiranja proteinom DLL1 otopljenim u mediju, u petrijevku je dodan medij RPMI i protein DLL1 u konačnoj koncentraciji 1 μg/ml, te je nakon inkubacije od 1,5 h na 37° C nasađeno 1 x 10^6 stanica 697 u mediju sa serumom.

3.4. *Određivanje krivulje rasta i vijabilnosti*

Suspenzijske su stanice nasađene u petrijeve posude za uzgoj stanica (promjera 35 mm) u optimalnoj koncentraciji (4 x 10^5 st/ml) u volumenu od 1,5 ml hranjivog medija. Svaki drugi dan stanice su izbrojane tako što bi se prvo resuspendiralo stanice, izjednačio volumen na 1,5 ml, a zatim uzeo alikvot za brojanje. Za daljnji tijek eksperimenta nasadila bi se trećina volumena stanica (0,5 ml) u 1 ml novog medija. Broj stanica određen je pomoću Bürkerove komorice (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Njemačka). Vijabilnost stanica određena je bojanjem stanica tripanskim modrilom (Gibco, Massachusetts, SAD).

3.5. Umnažanje plazmida

Plazmidi od interesa uneseni su u soj DH5α bakterije *Escherichia coli* elektoporacijom (Biorad MicroPulser, Kalifornija, SAD) ili u kemijski kompetentni soj XL10-Gold kemijskom transformacijom. Za elektroporaciju korištene su elektroporacijske kivete promjera 1 mm (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka). 50 μl bakterija transformirano je sa 100-200 ng plazmida i nakon inkubacije od 45 min bakterije su nasađene na selektivne antibiotske ploče. Iz zasebnih kolonija su uzgojene prekonoćne kulture u 3 ml tekućeg LB-Medija (Carl Roth), također uz dodatak odgovarajućeg antibiotika (ampicilin 100 μg/ml, kanamicin 50 μg/ml). Iz dobivene bakterijske kulture izolirani su plazmidi pomoću kompleta za izolaciju *Wizard Plus SV Mnipreps DNA Purification System* (Promega, Wisconsin, SAD) prema protokolu proizvođača.

Na talog bakterija dobivenih iz 3 ml prekonoćne kulture dodano je 250 μl otopine za resupendiranje stanica (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 μg/ml RNaza A), 250 μl pufera za lizu (0.2 M NaOH, 1 % SDS), te 10 μl otopine alkalne proteaze. Nakon inkubacije od 5 min pri sobnoj temperaturi dodano je 350 μl otopine za neutralizaciju (4.09 M gvanidin hidroklorid, 0.759 M kalij acetat, 2.12 M ledena octena kiselina, pH= 4,2). Nakon centrifugiranja (14000 x g, 10 min) supernatant je prebačen u kolonice za pročišćavanje plazmida. Kolonice su isprane s ukupno 1 ml otopine za ispiranje (60 % etanol, 60 mM kalij acetat, 8.3 mM Tris-HCl, 0.04 mM EDTA). Nakon toga plazmid je eluiran u 100 μl deH_2O.

3.6. *Kloniranje plazmida*

Insert od interesa umnožen je pomoću specifičnih početnica na kalupu cDNA iz stanica koje eksprimiraju ciljani gen, te polimeraze *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, Massachusetts, SAD). Dobiveni produkt pročišćen je iz 1 % agaroznog gela pomoću kompleta *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), dodana mu je krajnja baza adenin pomoću Taq polimeraze (Sigma Aldrich) te je insert ligiran u plazmid pGEM Easy (Promega, 3015 pb).

Za ligaciju je korištena T4 DNA ligaza (Promega), 1 x pufer (30 mM Tris-HCl (pH 7.8 at 25°C), 10 mM MgCl2, 10 mM DTT, 1 mM ATP), počišćeni vektor i insert u omjeru 1:3 uz inkubaciju preko noći pri 16°C.

Kompetentne bakterije DH5α su transformirane elektoporacijom i selektirane su bakterije s unesenim insertom. Budući da ugradnja inserta unutar operona lacZ sprječava ekspresiju gena za enzim β-galaktozidazu, kolonije s insertom su bijele boje (tzv. plavo-bijela selekcija). Iz pozitivnih bakterijskih kolonija pročišćen je plazmid koji je zatim podvrgnut digestiji pomoću restrikcijskog enzima EcoRI HF (New England Biolabs). Digestija restrikcijskim endonukleazama odvijala se u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala specifičan pufer (50 mM kalijev acetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM magnezijev acetat, 100 µg/ml BSA, pH 7.9 pri 25°C; New England Biolabs), 1 µg pDNA te 0,2 U/µl restrikcijskog enzima, a odvijala se pri 37 ° C kroz 1 h.

Insert je pročišćen iz 1 % agaroznog gela kompletom Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) i ukloniran u vektor pCDNA3 (Thermo Fisher Scientific, 5446 pb), prethodno pocijepanim enzimom EcoRI i podvrgnutim uklanjanju fosfatnih skupina goveđom crijevnom alkalnom fosfatazom CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, TaKaRa, Kusatsu, Japan). Reakcija defosforilacije se odvijala u puferu (500 mM Tris-HCl, 10 mM magnezijev klorid, pH 9.0), kroz 5 min pri 37°C uz 1 U enzima, nakon čega je linearizirani vektor pročišćen iz gela. Nakon ligacije napravljena je transformacija elektrokompetentnih bakterija DH5α plazmidom, a izolirani plazmidi odgovarajuće veličine podvrgnuti su digestiji specifičnim restrikcijskim enzimima (New England Biolabs) kako bi se utvrdila ispravna orijentacija inserta.

3.7. Transfekcija stanica u suspenziji

Transfekcija stanica napravljena je pomoću kompleta *FuGENE® HD Transfection Reagent* (Promega) prema uputama proizvođača. Mape korištenih plazmida nalaze se u prilogu 4.

Napravljena je smjesa reagensa i plazmidne DNA, u mediju bez seruma u volumenu od 20 µl. Omjer transfekcijskog reagensa FuGene HD i plazmidne DNA iznosio je 1 µl : 500 ng. Nakon inkubacije (10 min) smjesa je nakapana na stanice. Transfekcija se odvijala u pločici s 24 bunarčića, u volumenu od 500 µl s 0,25 x 10^6 stanica.

48 h nakon transfekcije započeta je selekcija pomoću odgovarajućih antibiotika. Prethodno je napravljena titracijska krivulja i određena optimalna koncentracija antibiotika za svaku liniju, tako što su stanice uzgajane u mediju s antibiotikom dodanim u različitim koncentracijama. Odabrana je najniža koncentracija antibiotika pri kojoj su sve stanice uginule u optimalnom vremenu. Transficirane stanice uzgajane su u selekcijskom mediju (za antibiotik geneticin (G418) Jurkat 400 µg/ml; CLL 100 µg/ml) kroz dva tjedna. Pomoću serijskog razrijeđenja stanične suspenzije na 0-2 st/ml, u pločici za uzgoj stanica od 96 bunarčića u 100 µl medija uzgojene su klonalne linije transficiranih stanica.

3.8. Izolacija genomske DNA

Na stanični talog od 10^6 stanica dodano je 100 µl digestijskog pufera (50 mMTris - pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5 % Tween 20) i 2 µl Proteinaze K (20 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD). Smjesa je inkubirana preko noći na 37°C, uz protresanje (300 rpm). Zatim je uslijedila inkubacija na 95° C kroz 8 min kako bi se inaktivirala proteinaza K. Nakon centrifugiranja (900 x g, 5 min) supernatant je korišten je kao kalup za lančanu reakciju polimerazom.

3.9. Izolacija RNA i reverzna transkripcija

Ukupna RNA izolirana je uz pomoć *TRI reagent* (Sigma Aldrich) prema uputama proizvođača.

Stanice su prikupljene centrifugiranjem (900 x g, 5 min, 4°C), isprane u fosfatnom puferu (PBS), te je na 5 x 10^6 stanica dodano 500 µl TRI reagensa). Lizat je inkubiran 5 min na ledu. Zatim je dodano 100 µl hladnog kloroforma te je cijela smjesa potresana kroz 15 sec. Nakon inkubacije od 7 min na ledu i centrifugiranja (14000 x g, 15 min, 4°C), gornja vodena faza je odvojena i dodano je 250 µl izopropanola (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Taloženje RNA odvijalo se kroz 30 min na -

80°C. Nakon centrifugiranja na 14000 x g, 15 min pri 4°C talog je ispran s 500 µl 75 % etanola. Nakon sušenja talog je otopljen u vodi bez RNAza.

Kvaliteta tako dobivene RNA provjerena je elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (100 V, 15 min), te je uz pomoć uređaja NanoVue (GE Life Sciences, New York, SAD) spektrofotometrijski određena njezina koncentracija i čistoća iz omjera apsorbancija A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230}. Samo RNA zadovoljavajuće kvalitete korištena je za reverznu transkripciju.

Reverzna transkripcija

RNA je prepisana u cDNA u reakciji koja je sadržavala 125 ng nasumičnih heksamera (Carl Roth), 500 µM dNTP mix (Sigma Aldrich), 2 µg RNA i vode očišćene od RNaza do volumena od 10 µl. Reakcijska smjesa stavljena je 5 min na 65°C da bismo denaturirali RNA, a zatim je naglo ohlađena na ledu kroz 5 min. Potom je u reakcijsku smjesu dodano 20 U RNaznog inhibitora (Applied Biosystems), 100 U reverzne transkriptaze (PrimeScript, TaKaRa), 4 µl 5x pufera (250 mM Tris-HCl, 375 mM kalijev klorid, 15 mM magnezijev klorid, pH 8,3; TaKaRa) i voda očišćena od RNaza do volumena od 20 µl. Reakcijska smjesa inkubirana je 10 min na 30°C, 60 min na 42°C, te 15 min na 70°C. Nakon reakcije u smjesu je dodano još 20 µl vode očišćene od nukleaza. Uspješnost reverzne transkripcije provjerena je lančanom reakcijom polimeraze pomoću početnica za gen *HPRT1* (umnožen odsječak veličine 700 pb).

3.10. Lančana reakcija polimerazom i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Pojedine sekvence DNA umnažale su se lančanom reakcijom polimerazom (PCR) u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala pufer (10 mM Tris-HCl, 50 mM kalijev klorid, pH 8.3 pri 20 °C, Sigma Aldrich), $MgCl_2$ (0,5 mM, Applied Biosystems), dNTP (0,2 mM, Sigma Aldrich), 1,5 µl cDNA, početnice F (0,2 µM) i R (0,2 µM), 1 U Taq polimeraze (Sigma Aldrich), te vodu očišćenom od nukleaza do ukupnog volumena od 25 µl.

Za reakciju PCR korišten je uređaj *ProFlex* (Applied Biosystems) prema programu: 94 °C kroz 5 min, 35-40 ciklusa (94 °C 30 s, T_m °C 30 s, 72 °C 20-60 s), 72 °C kroz 7 min.

Reakcijska smjesa u kojoj je korištena DNA polimeraza *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) sadržavala je reakcijski pufer (New England Biolabs), Q5 High GC Enhancer (New England Biolabs), 200 µM dNTP, 0,2 µM početnica, 100 ng DNA kalupa i 0.02 U/µl Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs).

Reakcija je tekla prema programu: 98 °C kroz 30 s, 30-35 ciklusa (98 °C 15 s, T_m °C 30 s, 72 °C 30 s/kb), 72 °C kroz 2 min.

Reakcijska smjesa za umnažanje polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) sadržavala je 1x reakcijsku smjesu s polimerazom *GoTaq qPCR Master Mix* (200 μM dNTP, 1,5 mM magnezijev klorid, pH 8,5; Promega), početnice F i R (0,2 μM), 1 μl cDNA i vodu do 15 μl. Reakcija qRT-PCR odvijala se prema programu: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 ciklusa (95°C 15 s, 58°C 1 min), faza izračuna krivulje taljenja (od 60°C do 95°C po 1 % rast temp). Za qRT-PCR korišten je uređaj *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD).
Ciklus praga (Ct) određen je na linearnom dijelu amplifikacijske krivulje PCR-a pomoću softvera 7500 Software version 2.0.6. (Applied Biosystems).

Učinkovitost reakcije PCR izračunata je iz nagiba amplifikacijske krivulje u eksponencijalnoj fazi, pomoću softvera za linearnu regresiju (LinRegPCR 2014.x) (Ruijter *i sur.*, 2009). Birane su one početnice čija je efikasnost u zadanim uvjetima bila veća od 90 %. Krivulja taljenja produkata reakcije je korištena za određivanje specifičnosti produkta. Rezultati su obrađeni prema opisu (Livak i Schmittgen, 2001).

3.11. Dizajn početnica

Podaci o podudarnim sljedovima nukleotida gena i granicama egzona/introna dobiveni su iz baze podataka projekta *Ensembl* (http://www.ensembl.org/index.html). Početnice su dizajnirane pomoću softvera *Primer3Plus* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus .cgi) i *IDT PrimerQuest Tool* (http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Početnice su dizajnirane tako da se nalaze na dva različita egzona da se izbjegne umnažanje genomske DNA. Kako bi imale istu učinkovitost umnažanja, dizajnirane su tako da imaju sličan broj parova baza, slične temperature taljenja (Tm), sadržaj GC oko 50 % i maksimalnu vrijednost ΔG zadnjih pet baza od 3 'kraja. Jedinstvenost vezanja na ljudski genom provjerena je u programu *BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Sve početnice provjerene su da ne stvaraju homodimere i heterodimere u programu *Multiple primer analyzer* (https://www.thermofisher.com/hr/en /home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/ molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html).
Kompatibilnost početnica i veličina umnoženih fragmenata provjerena je pomoću softvera

AmplifyX (http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/). Osim provjera *in silico*, početnice su provjerene i u stvarnim reakcijskim uvjetima. Popis svih početnica i njihove sljedove nukleotida nalaze se u prilogu 1.

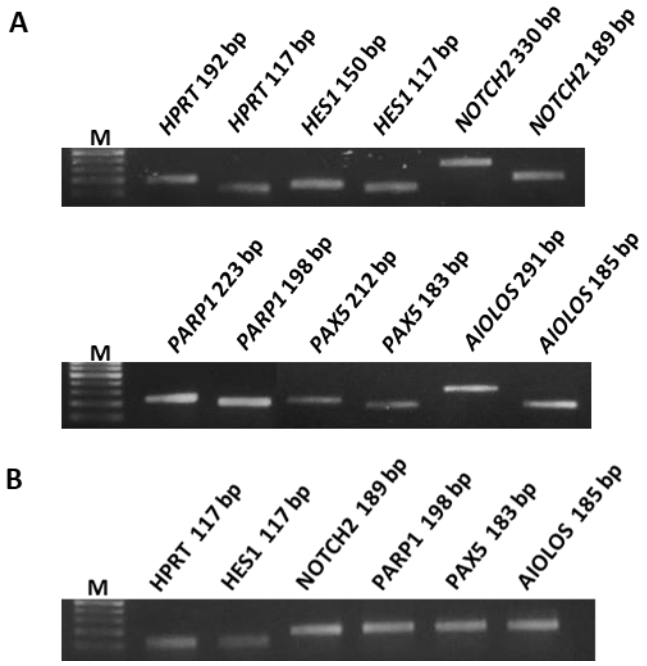
3.12. Višestruka lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Metoda *višestrukog qRT-PCR-a* omogućava direktnu reverznu transkripciju iz staničnog lizata bez izolacije RNA i analizu ekspresije seta gena iz malog broja stanica. Ova metoda je optimizirana i prilagođena prema prethodno opisanom protokolu (Peixoto *i sur.*, 2004), a usporedba između starog i novog protokola vidljiva je u prilogu 2.

Stanice su lizirane u 5 µl PBS-DEPC metodom smrzavanja i otapanja, smrzavanjem na -80 ° C i zagrijavanjem na 65 °C 2 minute. Nakon naglog hlađenja na 4°C, RNA se specifično prepisuje u cDNA direktnim dodavanjem smjese specifičnih R (3') početnica do koncentracije od 100 nM, pufera *First Strand Bufer* (50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM kalijev klorid, 3 mM magnezijev klorid; Gibco), 0,01 M DTT (Gibco), 500 µM dNTP (Applied Biosystems), 20 U RNAznog inhibitora (Agilent, Kalifornija, SAD) i 50 U reverzne transkriptaze MmuLV (Applied Biosystems) u ukupnom volumenu od 20 µl. Reakcija je zaustavljena nakon 50 minuta inkubacije na 42 °C, 15-minutnom inkubacijom na 70 °C.

cDNA dobivena direktnom reverznom transkripcijom iz staničnih lizata prvo se umnožila u reakciji I (PCRI). Za reakciju je korišteno 2,5 µl cDNA. Svaka reakcija sastojala se od pufera za PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM kalijev klorid, pH 8.3 pri 20 °C ; Sigma Aldrich), 2 mM $MgCl_2$ (Sigma Aldrich), 0,2 mM dNTP mix (Applied Biosystems), 1 U Taq DNA polimeraze (Sigma Aldrich) te 0,015 µM svakog od specifičnih primera (F1 i R) u volumenu od 25 µl. Uvjeti reakcije su bili: 94 °C 5 min, 15 ciklusa (94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s), 72 °C kroz 7 min.

Da bi se postigla veća specifičnost reakcije, prva reakcija PCRI poslužila je kao kalup za drugu reakciju, PCRII, poluugnježđenu, s početnicama F2 koje prepoznaju sekvence unutar fragmenata umnoženih prvom reakcijom. Za drugu reakciju PCR kao kalup korišten je 1 µl produkta iz reakcije PCRI, zajedno s 150 nM početnica (F2 R) za svaki od odabranih gena u zasebnoj reakciji. PCRII reakciju moguće je raditi i kao običan PCR ili kao qRT-PCR, a korišteni su prethodno opisani standardni protokoli.



Slika 9. Validacija strategije izrade početnica (A) Analiza efikasnosti početnica: reakcije PCR koje umnažaju fragmente cDNA pomoću para početnica F1R ili F2R trebaju imati jednaku učinkovitost. Učinkovitost dizajniranih početnica ispitana je na smjesi cDNA dobivenoj iz četiri stanične linije. (B) Analiza kompeticije početnica: 12 početnica prisutnih u istoj reakcijskoj smjesi ne smiju se međusobno vezati. Nakon reakcije umnažanja cDNA PCRI, sa 6 parova početnica istovremeno, postavljene su odvojene reakcije PCR s polu-ugniježđenim početnicama F2 i R radi analize specifičnosti reakcije. M: 100 bp DNA marker; *HPRT, HES1, NOTCH2, PARP1, PAX5, AIOLOS*: umnoženi sljedovi nukleotida gena od interesa; duljine produkata PCR navedene su s imenom gena (duži produkti dobiveni su pomoću para početnica F1 i R, a kraći pomoću para F2 i R). Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018.

3.13. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Fragmenti DNA izolirani su iz agaroznog gela pomoću kompleta *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Fragment DNA vizualiziran pomoću boje *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific) u 1 % agaroznom gelu, izrezan je i dodana je ekvivalentna količina otopine (*Membrane Binding Solution;* 4.5 M gvanidin izotiocijanat, 0.5 M kalij acetat (pH 5.0)). Nakon inkubacije od 10 minuta na 60 °C smjesa je prebačena u kolonicu i centrifugirana 1 min

na 140000 x g, isprana s otopinom za ispiranje (*Membrane Wash Solution*; 10 mM kalij acetat (pH 5.0), 80 % etanol, 16.7 μM EDTA (pH 8.0)) te eluirana vodom.

3.14. Protočna citometrija

Protočnim citometrom može se analizirati veličina stanica (pomoću metode eng. *forward scatter*), zrnatost (pomoću metode eng. *side scatter*), te intenzitet svjetlosti fluorokroma, bilo vezanim za stanične strukture pomoću antitijela, bilo prisutnim u stanici.

Prilikom istraživanja korištena su dva instrumenta za protočnu citometriju: protočni razvrstavač stanica (SONY SH800, SONY, Tokio, Japan), te protočni uređaj za analizu FACS Calibur (Becton Dickinson, New Jersey, SAD) uz pomoć pripadajućeg programa CellQuest.

Protočna je citometrija korištena za detekciju apoptoze u staničnim kokulturama. Stanice iz kokulture profiltritrane su kroz 30 μm filtar (Becton Dickinson), istaložene i isprane dva puta u PBS-u s 5 % FCS. Na stanice je dodana otopina aneksina-V-FITC (2,5 μg/ml) ili propidij jodida (2,5 μg/ml), ili njihove kombinacije, u puferu za vezanje (10 mM HEPES/NaOH, 150 mM natrijev klorid, 5 mM kalijev klorid, 1 mM magnezijev klorid, 1,8 kalcijev klorid, pH 7,4) te su zatim stanice analizirane protočnom citometrijom prema koncentraciji fluorokroma (Ambriović Ristov *i sur.*, 2007).

3.15. Izolacija staničnih proteina i određivanje njihove koncentracije prema metodi Bradford

Proteini su izolirani iz stanica uzgojenih u kulturi lizom membrana neionskim detergentom. Na stanični talog dodano je 50 μl hladnog pufera za lizu (20 mM Tris HCl pH 7.5, 137 mM NaCl (Kemika), 2 mM EDTA (Sigma Aldrich) pH 8.0, 10 % glicerol (Carl Roth), 1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich), 100 μg/ml PMSF (Sigma Aldrich), 1 μg/ml leupeptin (Sigma Aldrich), 100 μg/ml natrijev ortovanadat (Sigma Aldrich) i 1 μl inhibitora proteaza (Carl Roth)), te je talog inkubiran 10 minuta na ledu i zatim smrznut u tekućem dušiku i pohranjen na -80 ^{o} C. Proteini su centrifugirani 15 minuta na 12000 rpm pri 4°C i odvojeni od taloga.

Koncentracije proteina određena je metodom po Bradfordu koja se temelji na pomaku maksimuma apsorbancije od 465 nm na 595 nm pri vezanju boje Coomasie briljant plavo (CBB, Carl Roth) za proteine u kiseloj otopini, što uzrokuje plavo obojenje. Proteinski lizat razrijeđen je 10 x Bradfordovim reagensom (100 mg CBB G-250, 50 ml 95 % etanola, 100 ml 85 % fosforne kiseline te voda do ukupnog volumena od 1 L). Baždarna krivulja napravljena je pomoću

albumina goveđeg seruma (BSA od eng. *Bovine serum albumin*, New England Biolabs) u rasponu koncentracija od 0 do 10 μg po reakciji. Absorbancija je izmjerena na spektrofotometru *Glomax* (Promega).

3.16. Westernska metoda otiska

3.16.1 Razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu

Proteini se u SDS-elektroforezi u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) denaturiraju i oblažu detergentom te postaju negativno nabijeni i razdvajaju u električnom polju samo na temelju razlike u njihovoj molekularnoj masi. Proteini su zato prethodno inkubirani u puferu s reducirajućim agensom (225 mM Tris-HCl, 20 % (v/v) glicerol, 2 mM SDS, 0.02 % (w/v) bromfenol-plavo, 1 % β-merkaptoetanol) (Laemmli, 1970) i denaturirani 5 min pri temperaturi od 95 ^{o}C. Za izradu poliakrilamidnog gela korišten je vertikalni sustav za izlijevanje gelova Biometra Eco-Mini (Biometra, Jena, Njemačka). Svaki se gel sastojao od donjeg gela za razdvajanje proteina (10 %) i gornjeg gela za sabijanje (4 %). U jažice je nanešeno 25 μg proteina pomiješanih s puferom za nanošenje uzoraka te je cijela aparatura uronjena u pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3). Elektroforeza je tekla 120 min pri konstantnom električnom naponu od 130 V do početka donjeg gela, a zatim je napon povišen na 180 V (Sambrook, 2001).
Kao marker za određivanje molekularnih masa razdvojenih proteina korišten je *PageRuler Plus Prstained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scienfitic).

3.16.2. Prijenos proteina na membranu

Nakon razdvajanja elektroforezom proteini iz poliakrilamidnog gela preneseni su na membranu PVDF (Roche) u hladnom puferu za prijenos (48 mM Tris-HCl, 39 mM glicin, 0.037% SDS, 20% metanol, pH 8.3) (Sambrook, 2001). Korišten je uređaj za prijenos proteina u električnom polju Eco-Mini Tankblot (Biometra). U kazeti za prijenos složen je 'sendvič' sljedećeg sastava: donja spužvica, 2 komada navlaženog filtar papira, gel, membrana PVDF, 2 komada filtar papira i gornja spužvica. Složeni 'sendvič' uronjen je u pufer te se prijenos odvijao uz konstantnu jakost struje od 400 mA 120 min. Poslije prijenosa gel je obojen s otopinom za bojanje (0.25 % (m/v) boje Commasie Brilliant Blue CBB R-250 u smjesi (v/v/v) 45 % metanol : 10 % octena kiselina : 45% deH2O). Nakon blokiranja membrane u 5 % otopini nemasnog mlijeka ili u 3% otopini BSA

(ovisno o antitijelu) u puferu TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20), membrana je isprana puferom TBST i inkubirana preko noći u primarnom antitijelu. Primarna antitijela (Tablica 1.) razrijeđena su prema uputama proizvođača (1:500 do 1:3000) u 0.5 % nemasnom mlijeku (ili 0.3 % BSA) u puferu TBST. Sljedeći dan membrana je isprana 4 x 15 min u puferu TBST te inkubirana 60 min u otopini odgovarajućeg sekundarnog antitijela s konjugiranim enzimom peroksidazom hrena. Sekundarna antitijela bila su porijeklom iz koze (specifično za proteine miša, Sigma Aldrich), magarca (specifično za proteine kunića, GE Healthcare, Amersham, UK) i zeca (specifično za proteine koze, Sigma Aldrich) te su razrijeđena prema uputama proizvođača (1:5000 do 1:50000) u 0.5 % nemasnom mlijeku (ili 0.3 % BSA) u puferu TBST. Nakon inkubacije u mraku membrana je isprana 4 x 15 min u puferu TBST.

Proteini na membrani detektirani su reakcijom kemiluminiscencije. Membrana je inkubirana 1-3 min u komercijalnom kemiluminiscentnom supstratu *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad). Nakon inkubacije rendgenski film Super HR-U30 (Fujifilm, Tokio, Japan) je izložen luminiscenciji membrane 5-30 min, te su filmovi razvijeni u razvijaču i fiksirani u fiksiru (Efke Fotokemika, Samobor, Hrvatska). Filmovi su denzitometrirani u računalnom programu *ImageJ* (National Institutes of Health, SAD).

Tablica 1. Popis korištenih primarnih antitijela

Kataloški broj	**Antigen**	**Molekularna masa (kDa)**	**Domaćin**	**Razrjeđenje**	**Proizvođač**
#3608	NOTCH1 (D1E11)	120, 300	Zec	1:1000	Cell signaling technology
#4147	Cleaved NOTCH1 (D3B8)	110	Zec	1:1000	Cell signaling technology
#5732	NOTCH2 (D76A6)	110, 300	Zec	1:1000	Cell signaling technology
#11988	HES1 (D6P2U)	30	Zec	1:1000	Cell signaling technology
#14859	IKAROS (D6N9Y)	50-70	Zec	1:1000	Cell signaling technology

#8566	P-GSK-3-α/β (Ser21/9) (D17D2)	46,51	Zec	1:1000	Cell signaling technology
12456P	GSK-3-β (D5CZ)	46	Zec	1:1000	Cell signaling technology
#80775	BACH2 (D3T3G)	130	Zec	1:1000	Cell signaling technology
sc-515913	AIOLOS (H-8)	50,58,65	Miš	1:500	Santa Cruz Biotechnology
sc-69879	β-ACTIN (AC-15)	43	Miš	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
sc-1562	PARP1 (A-20)	116	Koza	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
sc-6011	JAGGED1 (C-20)	180	Koza	1:750	Santa Cruz Biotechnology

3.17. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka provedena je pomoću računalnog programa STATISTICA 12 (StatSoft Inc.). Usporedba kontrole i tretmana napravljena je pomoću T-testa (dvokraka distribucija, jednake varijance dvaju uzoraka). Kao statistički značajne razlike uzete su vrijednosti koje su se razlikovale na razini $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija staničnih linija

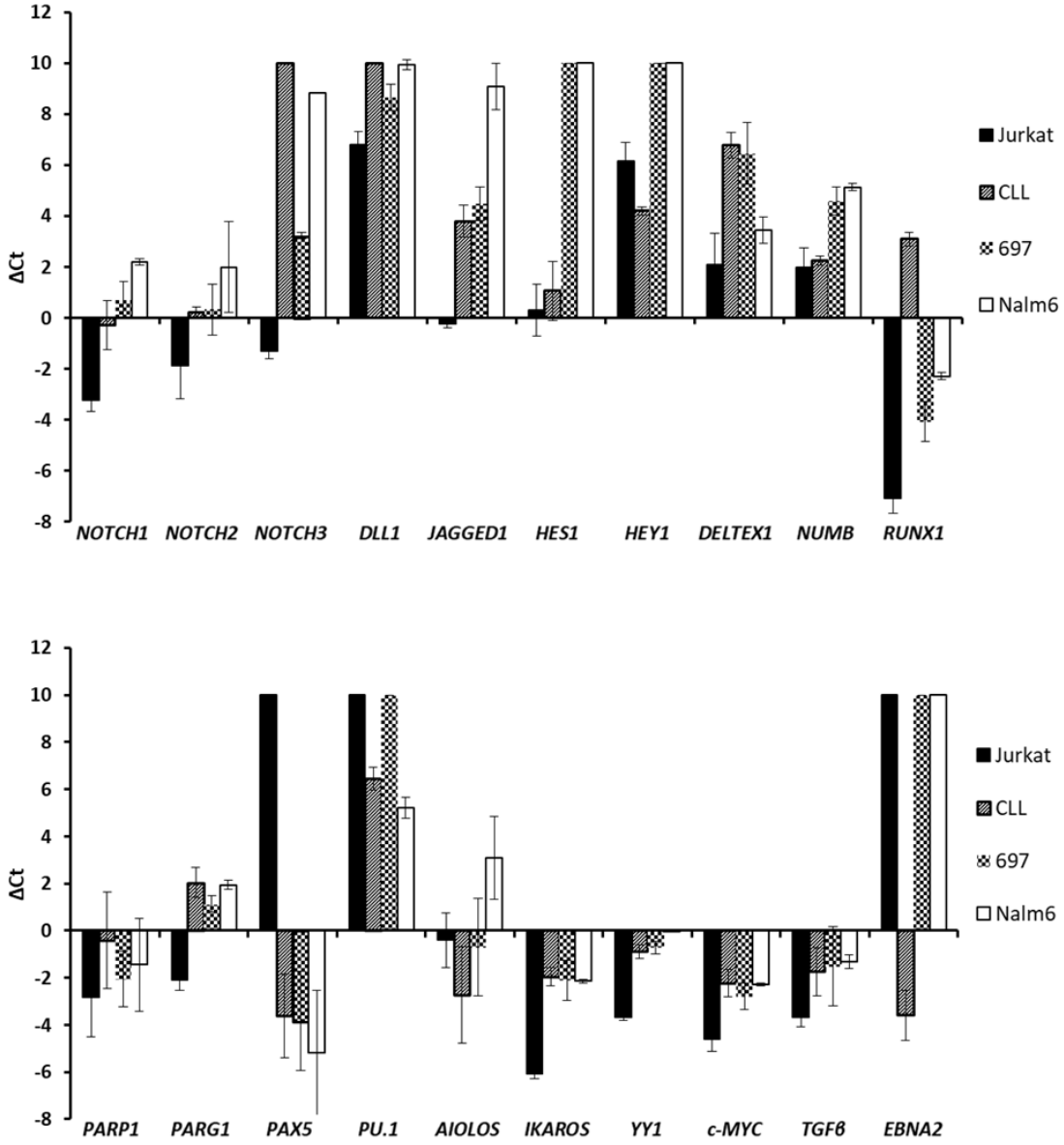
Kako bismo analizirali ulogu putova Notch i PARP u biologiji limfocita, odabrane su četiri linije leukemija limfocita T i B. Iz uzgojenih stanica izolirana je RNA, prepisana u cDNA, te reakcijom RT qPCR u njima istražena razina ekspresije osnovnih elemenata puta Notch: receptora *NOTCH1-3,* liganada (*DLL1, JAG1*), nizvodnih meta (*HES1, HEY1, DTX1*), kao i negativnih regulatora puta (*NUMB, RUNX1*). Sustav PARP analiziran je kroz ekspresiju gena *PARP1*, *PARG*, te *YY1* koji regulira ekspresiju gena *PARP1*. Također su analizirani pojedini biljezi diferencijacije, poput *PAX5* i *PU.1*, karakteristični za limfocite B. Ispitana je i ekspresija gena *c-Myc*, kao pokazatelja stanične proliferacije, TGFβ, faktora rasta i tumorskog supresora, kao i ekspresija transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros (*IKFZ1-IKAROS, IKFZ3-AIOLOS*). Naime, pokazano je da put Ikaros kompetira s putom Notch pri vezanju kompleksa za promotorske sljedove nukleotida ciljanih gena (Kathrein *i sur*., 2008).

Sve četiri stanične linije imaju eksprimirane receptore *NOTCH1* i *NOTCH2*. Receptor *NOTCH3* slabo je eksprimiran u liniji 697 i Nalm6, dok je u liniji Jurkat njegova ekspresija više od 20 puta veća. U staničnoj liniji CLL ekspresija receptora *NOTCH3* nije detektirana.

Ligand *DLL1* slabo je eksprimiran u stanicama Jurkat. Ligand *JAGGED1* prisutan je kod svih promatranih staničnih linija, osim kod stanica Nalm6 (Slika 10.). Ekspresija gena koji se nalaze nizvodno od puta Notch (*HES1, HEY1*) ukazuje da je put aktivan samo u stanicama Jurkat i CLL. Negativni regulatori puta *DELTEX1, NUMB i RUNX1* eksprimirani u sve četiri stanične linije. Geni *PARP, PARG, YY1, c-MYC, TGFβ* značajno su eksprimirani u sve četiri stanične linije.

Kako je pokazano da se NICD može natjecati za vezanje za specifične slijedove nukleotida s tumorskim supresorima iz porodice Ikaros (Chari and Winandy, 2008), ispitana je i njihova ekspresija. Pokazano je da su geni IKFZ1 i IKFZ3 eksprimirani u sve četiri stanične linije, a ekspresija *IKFZ1* i do četiri puta je veća kod stanica Jurkat nego kod ostalih. Transkripcijski faktor *PAX5* eksprimiran je u svim linijama porijeklom iz limfocita B (CLL, 697 i Nalm6), a transkripcijski faktor *PU.1* samo u staničnim linijama CLL i Nalm6. Uspostava linija iz primarnih stanica često zahtijeva imortalizaciju pomoću Epstein-Barrovog virusa. Zbog mogućih interferencija s putem Notch (Gunnell *i sur.*, 2016; Henkel *i sur.*, 1994) ispitana je i ekspresija

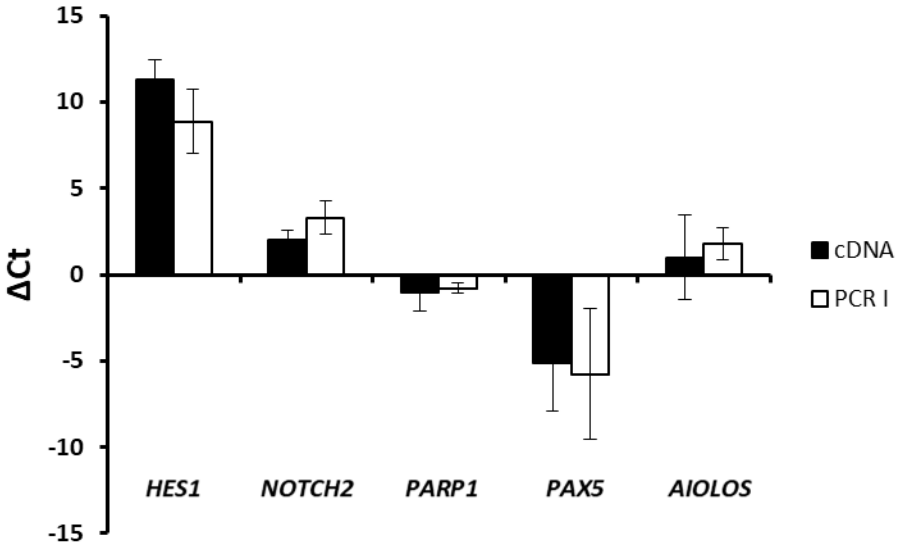
virusnog proteina EBNA2, porijeklom iz Epstein-Barrovog virusa, te je njegova prisutnost detektirana u staničnoj liniji CLL.



Slika 10. Karakterizacija genske ekspresije u staničnim linijama. RNA staničnih linija prepisana je reverznom transkripcijom i kvantificirana metodom qRT-PCR. Relativna ekspresija predstavljena je kao vrijednost ΔCt dobivena normalizacijom s vrijednostima ekspresije gena *HPRT1*. ΔCt vrijednost 10 znači da nije bilo umnažanja. Jurkat, 697, Nalm 6, CLL: stanične linije.

4.2. Višestruka analiza ekspresije RNA iz malog broja stanica

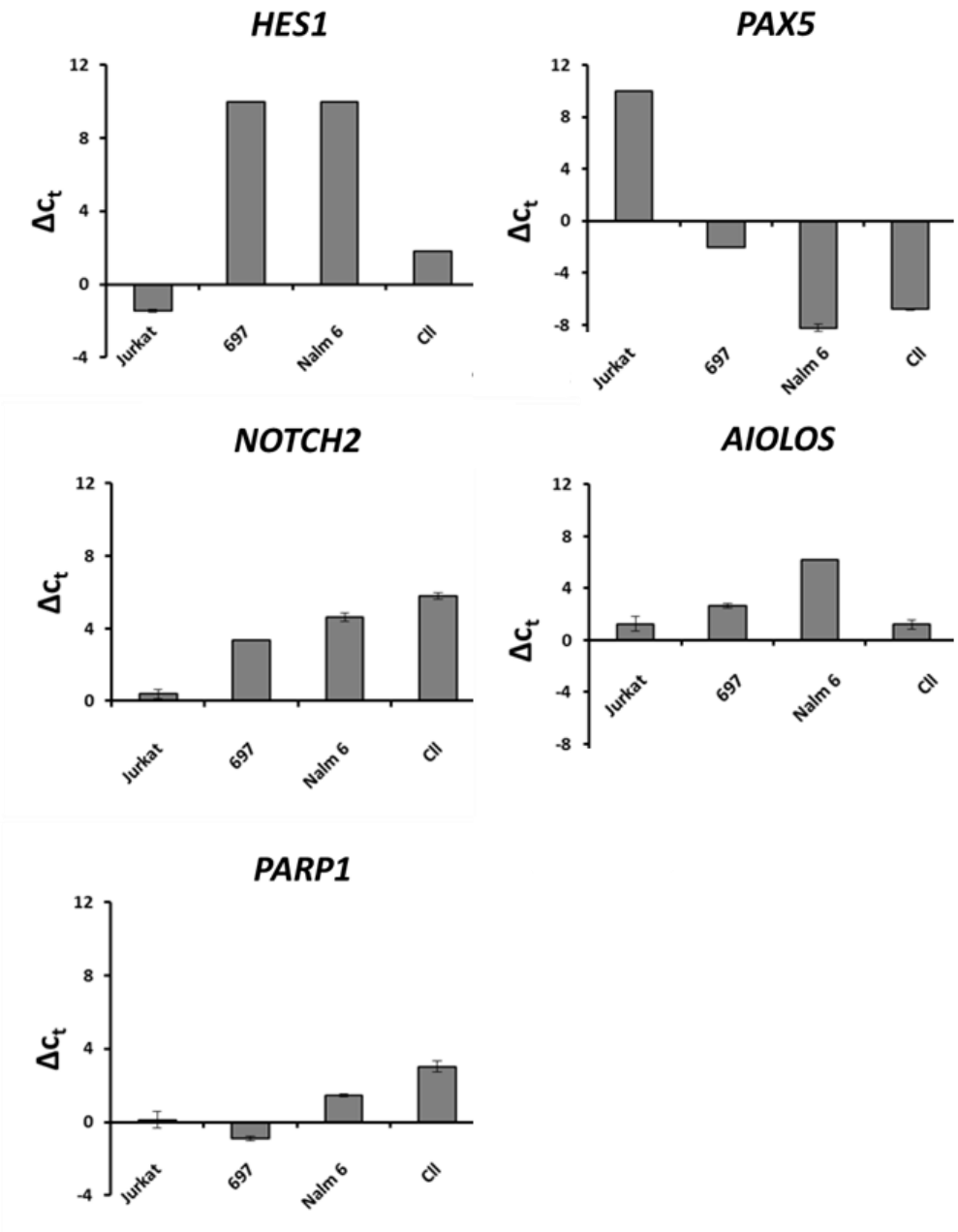
Usporedno s analizom cDNA dobivenom iz staničnih linija, analizirali smo ekspresiju manjeg seta gena putova Notch i PARP metodom direktne transkripcije i višestuke analize iz malog broja stanica. Naime kako je u budućim analizama predviđeno raditi s biološkim uzorcima koji uključuju mali broj stanica, odlučili smo uspostaviti, optimizirati i validirati ovu metodu. U ovom pristupu cDNA se reverzno prepisuje iz staničnog lizata malog broja stanica i to pomoću seta specifičnih početnica koje moraju zadovoljiti određene uvjete. Sve početnice u reakciji moraju biti jednako učinkovite i nekompetitivne (prilog 3.). Validacija je napravljena tako da su uspoređene normalizirane vrijednosti ekspresije gena dobivenih reakcijom qRT-PCR-om iz staničnih lizata i vrijednosti ekspresije dobivene klasičnim putem, nakon reverzne transkripcije izolirane RNA iz iste stanične linije. Validacija je napravljena na staničnoj liniji 697, a relativni odnosi ekspresije gena, kod uzoraka dobivenih izolacijom RNA i uzoraka staničnih lizata nisu se značajno razlikovale (Slika 11.).



Slika 11. Validacija višestruke direktne analize ekspresije iz malog broja stanica. Kvantitativna analiza ekspresije metodom qRT-PCR. Relativna ekspresija predstavljena je kao vrijednost ΔCt dobivena normalizacijom s ekspresijom gena *HPRT1*. ΔCt vrijednost 10 znači da nije bilo amplifikacije. cDNA: cDNA dobivena iz RNA izolirane iz $2x10^6$ stanica; PCRI: cDNA

dobivena direktnom reverznom transkripcijom iz lizata 500 stanica. Statistička značajnost (n = 3) određena je studentovim t-testom (p vrijednost > 0.05). Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018.

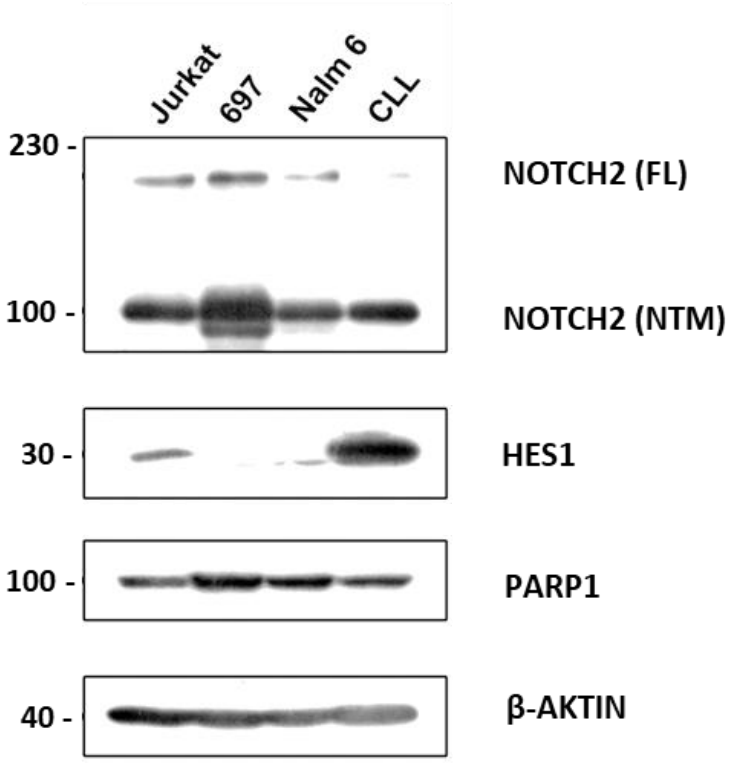
Nakon validacije istom metodom su karakterizirane sve četiri stanične linije (Slika 12.). Analizirana je ekspresija gena *HES1*, *NOTCH2*, *PARP1*, *PAX5* i *AIOLOS*. Ekspresija receptora *NOTCH2*, gena *PARP1* i *AIOLOS* detektirana je u sve četiri stanične linije. Ekspresija gena *HES1* detektirana je u staničnoj liniji Jurkat i CLL, dok ekspresija transkripcijskog faktora *PAX5* nije detektirana samo u staničnoj liniji Jurkat.
Dobiveni rezultati odgovaraju rezultatima karakterizacije staničnih linija standardnim postupkom.



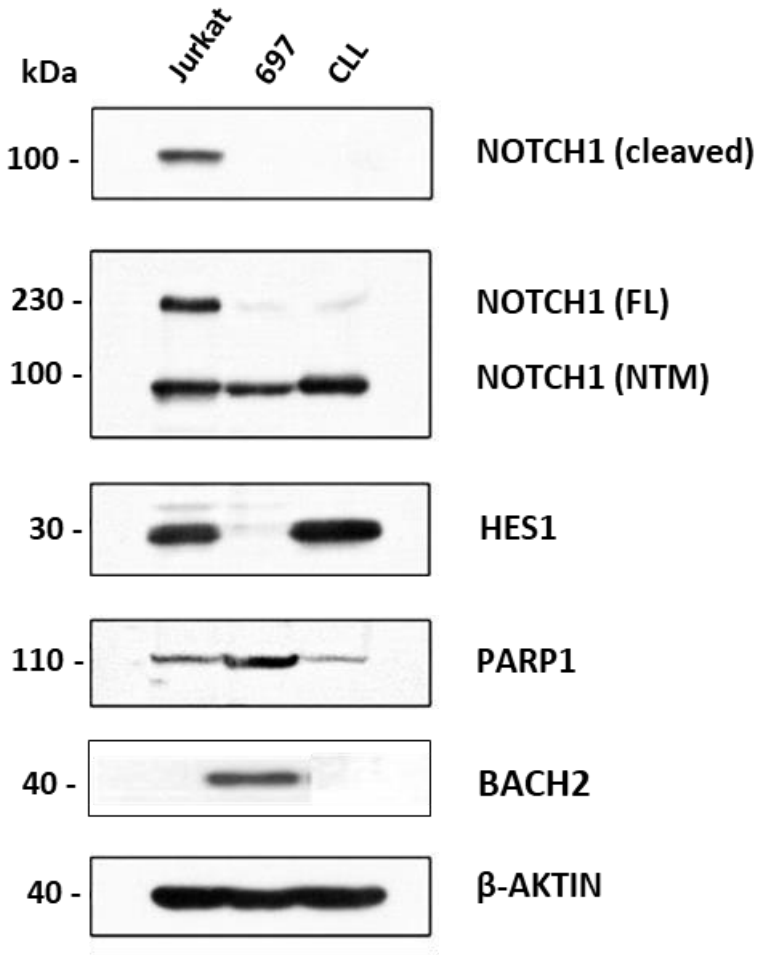
Slika 12. Kvantitativna analiza ekspresije gena u staničnim linijama metodom direktne analize ekspresije iz malog broja stanica. Stanični lizati 500 stanica reverzno su transkribirani pomoću specifičnih početnica i umnoženi kroz 15 ciklusa reakcije PCR. Reakcija qRT-PCR napravljena je pomoću drugog para početnica kao polu-ugniježđena reakcija. Slika prikazuje reprezentativni eksperiment i standardnu devijaciju dobivenu iz tri tehničke replike. Razine ekspresije prikazane su kao vrijednosti ΔCt. Vrijednost ΔCt 10 znači da nije bilo amplifikacije. Jurkat, 697, Nalm 6, CLL: stanične linije.

4.3. Analiza ekspresije proteina

Nakon analize na razini RNA, putove Notch i PARP okarakterizirali smo i na razini proteina. Kod modelnih staničnih linija pokazano je da sve linije eksprimiraju receptore Notch (Slika 13. i Slika 14). NICD1, tj. pocijepana domena receptora karakteristična za aktivan put, bila je prisutna samo u stanicama Jurkat. Ekspresija HES1, nizvodne mete puta Notch, bila je prisutna u stanicama Jurkat i CLL. PARP1 je bio prisutan u svim linijama, s jačom ekspresijom u limfocitima pre-B. BACH2, transkripcijski faktor bitan kod diferencijacije limfocita, bio je eksprimiran samo u stanicama linije 697.



Slika 13. Analiza ekspresije proteina NOTCH2, PARP i HES1 u staničnim linijama. Ukupni proteini izolirani su iz linije porijeklom iz T stanične akutne leukemije (Jurkat), B kronične limfocitne leukemije (CLL) i leukemije prekursora limfocita B (697, Nalm 6). FL: cijeli protein; NTM: transmembranska/unutarstanična regija; Ekspresija β-aktina korištena je kao mjera količine proteina. Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018.



Slika 14. Analiza ekspresije proteina povezanih s putem Notch i PARP. Ukupni proteini izolirani su iz linije porijeklom iz T stanične akutne leukemije (Jurkat), B kronične limfocitne leukemije (CLL) i leukemije prekursora B stanica (697). FL: punu duljinu; NTM: transmembranska/unutarstanična regija; Ekspresija β-aktina korištena je kao mjera količine proteina. Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018a.

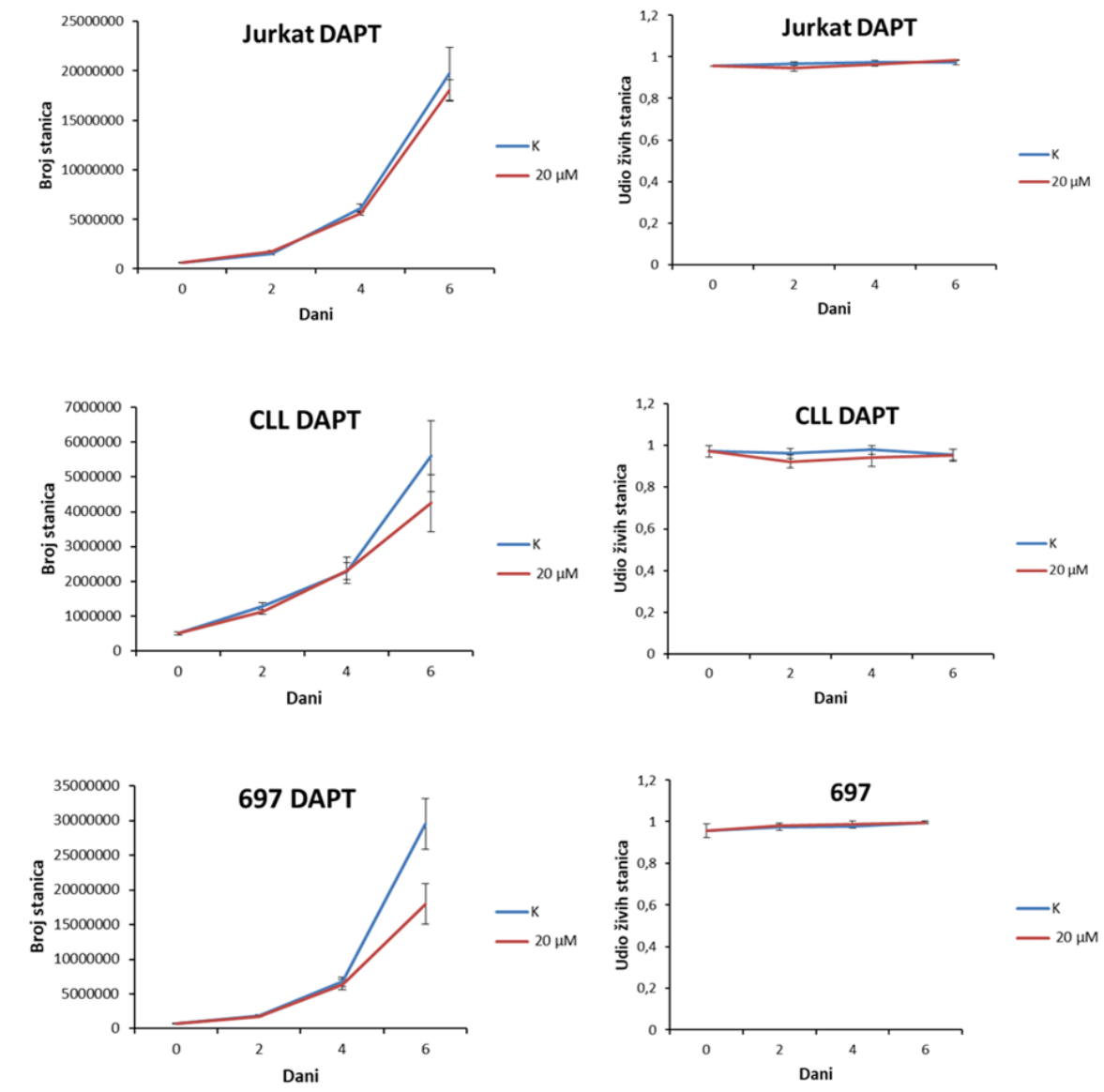
4.4. Inhibicija puteva Notch i PARP

Put Notch se smatra jednim od glavnih putova usmjeravanja stanica prema lozi limfocita T i često je njegova funkcija poremećena u leukemijama limfocita T. Određene vrste leukemije čak mogu biti "ovisne" o aktivnosti puta Notch i njegova inhibicija može utjecati na proliferaciju stanica (Palomero *i sur.*, 2006). S druge strane, poznato je da PARP može utjecati na strukturu staničnog kromatina i modulirati aktivnost faktora transkripcije te moguće interferirati s putom Notch

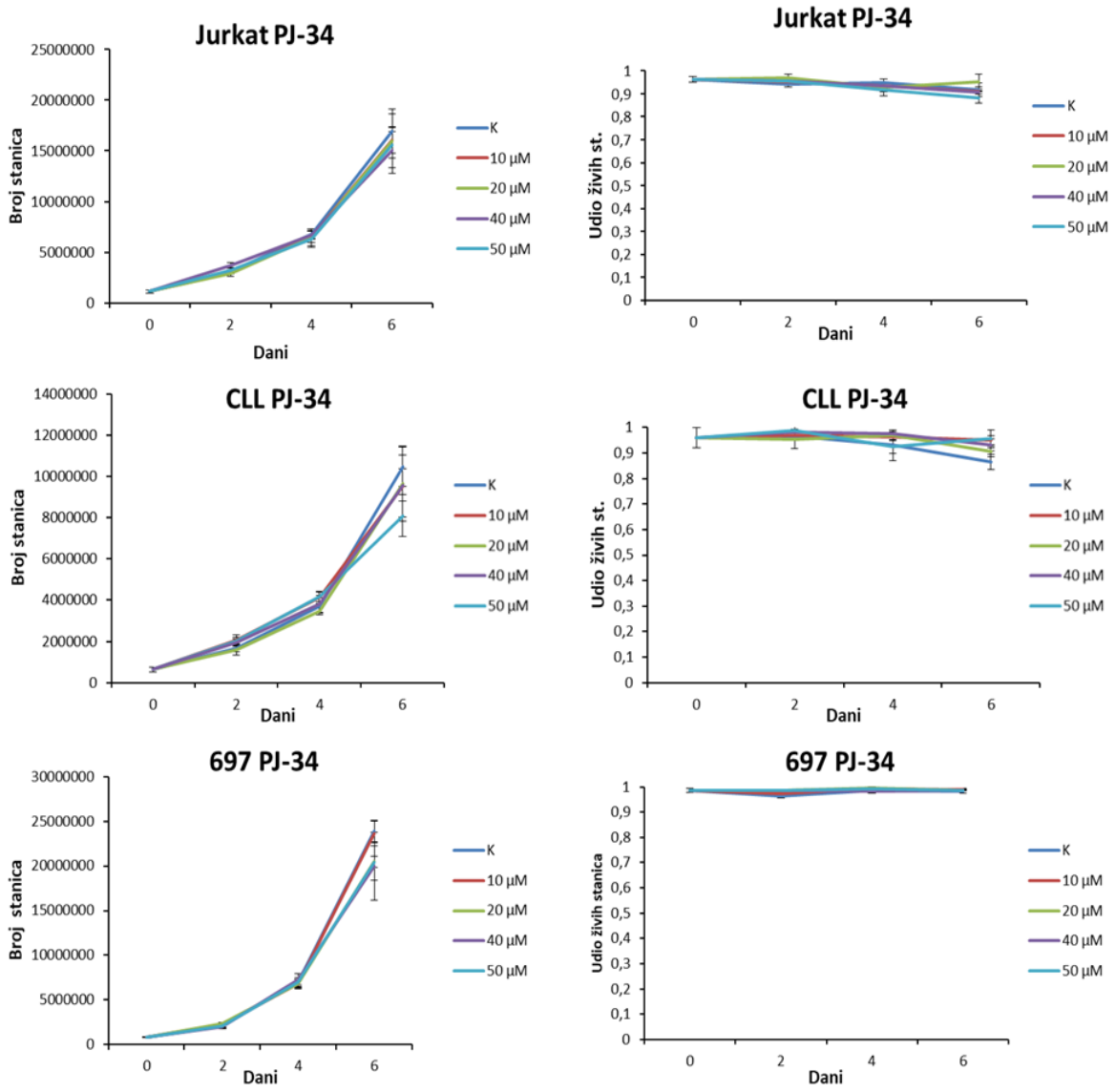
(Hassa i Hottiger, 2002; Krishnakumar i Kraus, 2010). Stoga smo analizirali kakav je efekt inhibicije puta Notch i aktivnosti proteina PARP kod staničnih linija B- i T-leukemija. Prethodna je analiza puta Notch u modelnim staničnim linijama pokazala je da je ovaj put aktivan u liniji Jurkat, kao i u staničnoj liniji CLL, dok kod pre-B stanica 697 nije. PARP1 je bio eksprimiran kod svih staničnih linija.

Prvo je analizirana stanična proliferacija i citotoksičnost tretmana s 20 μM inhibitorom γ-sekretaze, DAPT (Kogoshi *i sur.*, 2007). Inhibicija puta Notch nije značajno utjecala na proliferaciju stanica Jurkat. Proliferacija stanica 697 i CLL počela se smanjivati nakon četvrtog dana i značajno je smanjena kod linije 697 nakon 6 dana tretmana (Slika 15.). Vijabilnost svih staničnih linija bila je na razini kontrole.

Paralelno, stanice su tretirane različitim koncentracijama inhibitora aktivnosti enzima PARP, PJ-34 (Garcia Soriano *i sur.*, 2001). Nijedan od tretmana nije značajno promijenio staničnu proliferaciju, te nije bilo naznake citotoksičnosti u bilo kojoj od tri stanične linije. Iznimka je bila linija CLL-a koja je pokazala značajno smanjenu proliferaciju nakon 6 dana tretmana s 50 μM PJ-34 (Slika 16).



Slika 15. Krivulje proliferacije i vijabilnosti nakon tretmana inhibitorom DAPT. Stanične linije Jurkat, 697 i CLL tretirane su inhibitorom γ-sekretaze (DAPT) kroz 6 dana, svaki drugi dan. Ukupan broj stanica i udio živih stanica dobiveni su brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom pod svjetlosnim mikroskopom. C: kontrolne stanice; 10 µM, 20 µM, 40 µM, 50 µM: koncentracija dodanog inhibitora. Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018a.



Slika 16. Krivulje proliferacije i vijabilnosti nakon tretmana inhibitorom PJ-34. Stanične linije Jurkat, 697 i CLL tretirane su PARP inhibitorom (PJ-34) kroz 6 dana, svaki drugi dan. Ukupan broj stanica i udio živih stanica dobiveni su brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom pod svjetlosnim mikroskopom. C: kontrolne stanice; 10 µM, 20 µM, 40 µM, 50 µM: koncentracija dodanog inhibitora. Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018a.

4.4.1. Analiza ekspresije gena u staničnim linijama nakon inhibicije putova Notch i PARP

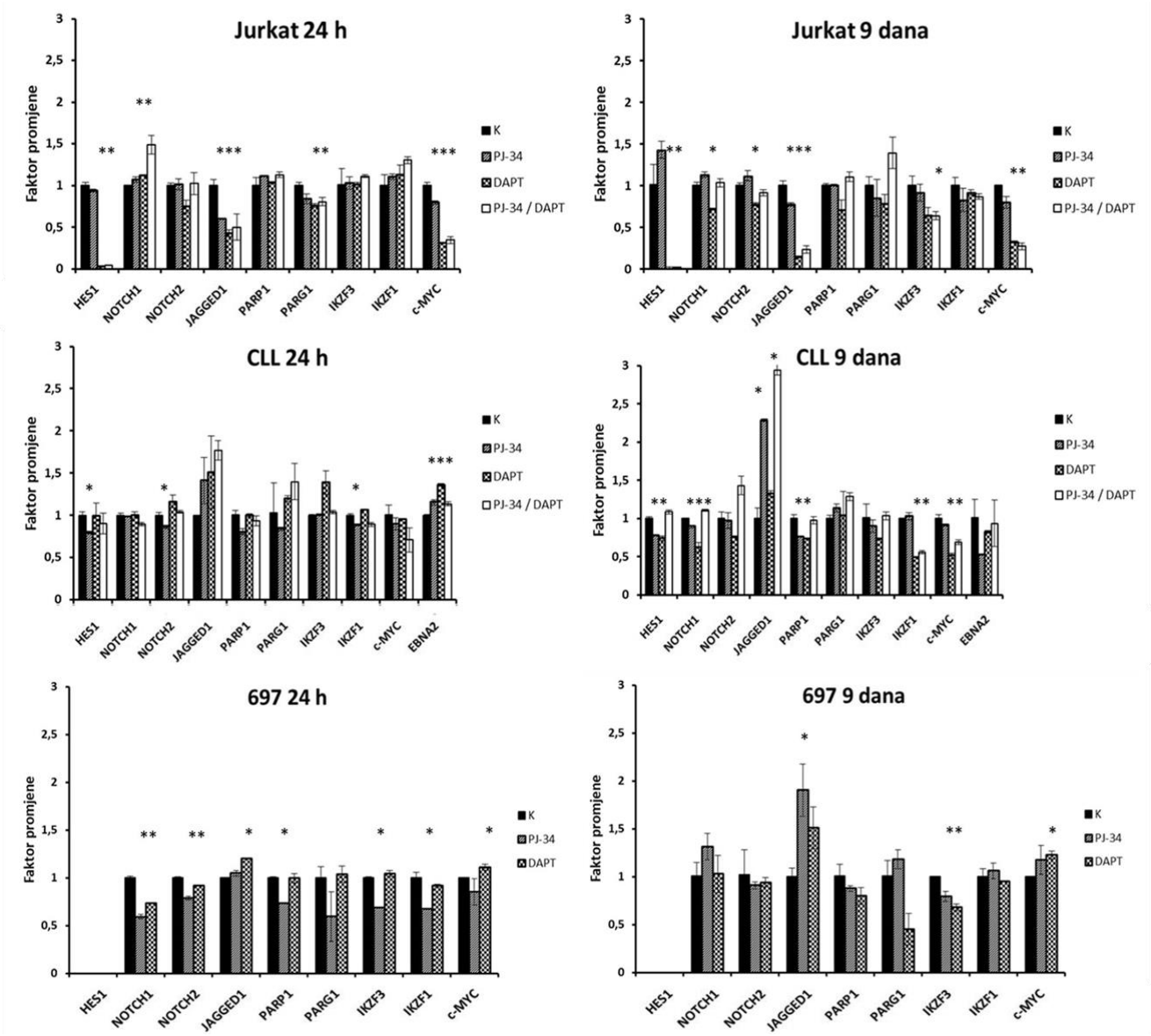
Ekspresija panela gena uključenih u putove Notch i PARP analizirana je nakon jednog i devetodnevnog tretmana s inhibitorima putova Notch i PARP, metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (Slika 17.). Stanična linija Jurkat pokazala je očekivano

smanjenje ekspresije gena *HES1*, kao nizvodnog produkta aktivacije puta Notch, u uzorcima tretiranim Notch inhibitorom tijekom 24 h i 9 dana. Ekspresija receptora *NOTCH1* i *NOTCH2* pokazala je oscilacije ovisno o tretmanu DAPT-om nakon 24 h i 9 dana. Ekspresija *c-MYC* smanjila se već nakon 24 sata od tretmana, te je ostala smanjena i nakon devetog dana tretmana inhibitorom DAPT. Također je došlo do smanjenja ekspresije gena *JAGGED1,* nakon jednog i 9 dana. Inhibicija PARP-a utjecala je na ekspresiju gena *JAGGED1*. *PARP1* i *PARG*, gen koji kodira enzim uključen u degradaciju poliADPriboznih lanaca, imali su ekspresiju jednaku kontroli neovisno o duljini tretmana. Također smo testirali ekspresiju *IKZF3* i *IKZF1*, dva člana porodice transkripcijskih faktora Ikaros, koji mogu kompetirati s putom Notch. Nakon tretmana od 24 h nije došlo do promjene u njihovoj ekspresiji, ali nakon 9 dana tretmana s inhibitorom DAPT, ekspresija *IKZF3* je bila smanjena ~ 40%.

Inhibicija γ-sekretaze tijekom 9 dana kod stanica linije CLL izazvala je samo blagi pad ekspresije *HES1* i *NOTCH1*. Drugi nizvodni cilj puta Notch, *c-MYC*, nije pokazao značajne razlike u ekspresiji nakon 24 sata, ali nakon 9 dana tretmana DAPT-om, ekspresija *c-MYC* je smanjena na ~ 50% kontrolne vrijednosti. Devetodnevna inhibicija γ-sekretaze inducirala je ~ 50 % smanjenje ekspresije *IKZF1*. Iako je poznato da stanice CLL mogu imati aktivni put Notch zbog mutacije receptora Notch, ove stanice nisu utišale ekspresiju gena *HES1* nakon inhibicije γ-sekretaze. Stoga je analizirana ekspresija proteina EBNA2 virusa EBV. Naime, stanične linije kroničnih leukemija limfocita B imortaliziraju se transdukcijom EBV, a poznato je da se njegov protein EBNA2 može vezati za ciljane sljedove nukleotida puta Notch (Henkel *i sur.*, 1994). U staničnoj liniji CLL detektirana je ekspresija *EBNA2*, i iz toga se može zaključiti da je ekspresija gena nizvodnih od puta Notch posljedica prisutnosti virusnog proteina. Iako je tretman od 24 h izazvao fluktuacije ekspresije EBNA2, nije bilo značajnih promjena nakon produljenog tretmana inhibitorima. Inhibicija PARP-a dovela je do povećanja ekspresije *JAGGED1* za više od 2 puta, u uzorcima tretiranim tijekom 9 dana.

Analizirana je i stanična linija 697 koja potječe od akutne limfocitne leukemije limfocita B i pokazuje fenotip pre-B limfocita. Iako te stanice nemaju aktivan put Notch, zbog neizravnog učinka inhibicije γ-sekretaze u ostalim staničnim linijama, ove stanice tretirane su samo pojedinačno inhibitorom PJ-34 i DAPT-om bez njihove kombinacije. Inhibicija γ-sekretaze smanjila je ekspresiju IKZF3 nakon 9 dana za ~ 30 %. Inhibicija PARP-a smanjila je ekspresiju *NOCH1, NOTCH2, PARP1, IKZF3* i *IKZF1* nakon 24 sata, ali dugotrajnim tretmanom većina je

tih učinaka nestala. PJ-34 je također povećao ekspresiju JAGGED1 gotovo dva puta nakon devetodnevnog tretmana.



Slika 17. Analiza ekspresije gena u staničnih linija nakon tretmana inhibitorima PJ-34 i DAPT tijekom 24 h i 9 dana. Stanice su tretirane inhibitorom PARP-a PJ-34 i/ili inhibitorom Notch-a DAPT svaki drugi dan kroz 9 dana, kad je izolirana ukupna RNA i nakon reverzne transkripcije napravljena analiza metodom qRT-PCR. Prikazani su reprezentativni rezultati triju nezavisnih eksperimenata. Relativna ekspresija prikazana je kao faktor promjene u usporedbi s vrijednostima kontrolnog uzorka. Kao endogena kontrola korištena je ekspresija gena *HPRT1*. C: kontrolne stanice, PJ-34: stanice tretirane s PJ-34 (10 μM za stanice Jurkat, CLL i 40 μM za

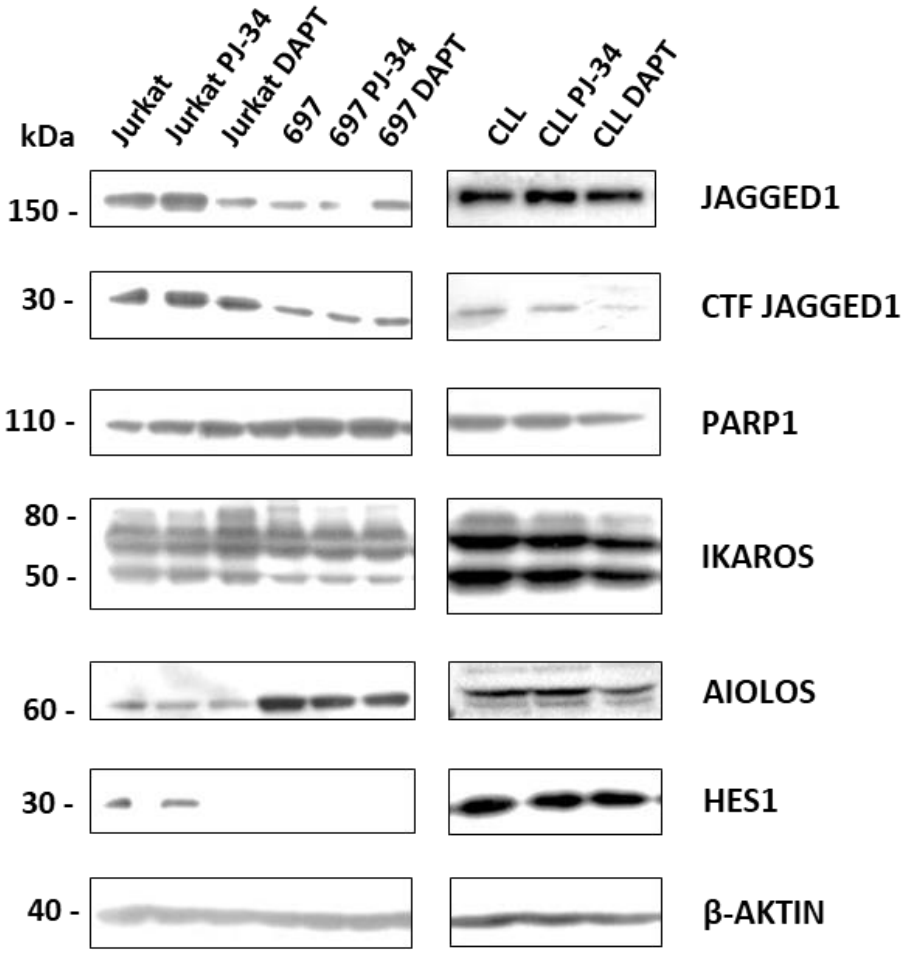
stanice 697), DAPT: 20 μM DAPT, PJ-34 / DAPT: stanice tretirane kombinacijom 10 μM PJ -34 i 20 μM DAPT; Statistička značajnost određena je studentovim t-testom: * p-vrijednost < 0,05. Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur.*, 2018a.

4.4.2. Analiza ekspresije proteina u staničnim linijama nakon inhibicije putova Notch i PARP

Geni čija se ekspresija mijenjala pod utjecajem inhibitora puta PARP i Notch analizirani su westernskom metodom otiska. Pratila se ekspresija proteina: liganda JAGGED1, PARP1, IKAROS, AIOLOS i HES1 nakon inhibicije puta Notch obradom s DAPT-om i inhibicije aktivnosti PARP-a, nakon 9 dana.

Analiza stanica Jurkat tretiranih tijekom 9 dana inhibitorom γ-sekretaze pokazala je inhibiciju ekspresije proteina HES1. Ekspresija proteina IKZF1 bila je jednaka u kontrolnim i tretiranim stanicama, a IKZF3 umjereno smanjena nakon tretmana. Ekspresija proteina JAGGED1 bila je smanjena na razini proteina. Inhibicija aktivnosti enzima PARP nije značajno promijenila ekspresiju HES1, IKZF3, IKZF1, PARP1 i JAGGED1 na razini proteina.

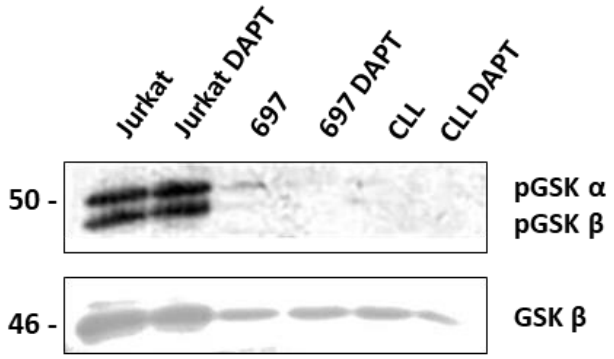
U staničnoj liniji CLL ekspresija proteina HES1 nije bila promijenjena nakon 9 dana inhibicije putova PARP i Notch. Razine IKZF1 i IKZF3 bile su niže kod stanica tretiranih DAPT-om. Ekspresija proteina PARP bila je slična u netretiranim i tretiranim stanicama, a ekspresija JAGGED1 neznatno povećana u stanicama tretiranim inhibitorom PARP (Slika 18). U stanicama 697 IKZF1 bio je na kontrolnoj razini, a IKZF3 je pokazao smanjenje ekspresije nakon tretmana s oba inhibitora. Povećanje ekspresije liganda JAGGED1 nije detektirano na razini proteina.



Slika 18. Analiza ekspresije seta proteina vezanih uz signalni put Notch i PARP nakon tretmana inhibitorima kroz 9 dana. Analiza je napravljena na staničnoj liniji T akutne limfocitne leukemije (Jurkat), B kroničnoj limfocitnoj leukemiji (CLL) i staničnoj liniji leukemije prekursora B stanica (697). Stanice su tretirane inhibitorom puta Notch (20 μM) ili inhibitorom aktivnosti enzima PARP1 (10 μM) tijekom 9 dana, kada su izolirani ukupni stanični proteini i analizirani westernskom metodom otiska. CTF: C-terminalni fragment; Ekspresija β-aktina korištena je kao mjera količine proteina. Preuzeto i prilagođeno prema Horvat *i sur*., 2018a.

4.4.3. Analiza puta kinaze glikogen sintaze

Budući da se kinaza glikogen sintaze (GSK) nalazi na čvorištu putova koji usmjeravaju razvoj i proliferaciju, istražena je njena aktivnost u staničnim linijama, te posljedice inhibicije puta Notch. GSK je aktivnost pokazala samo u stanicama Jurkat i nije ovisila o putu Notch.

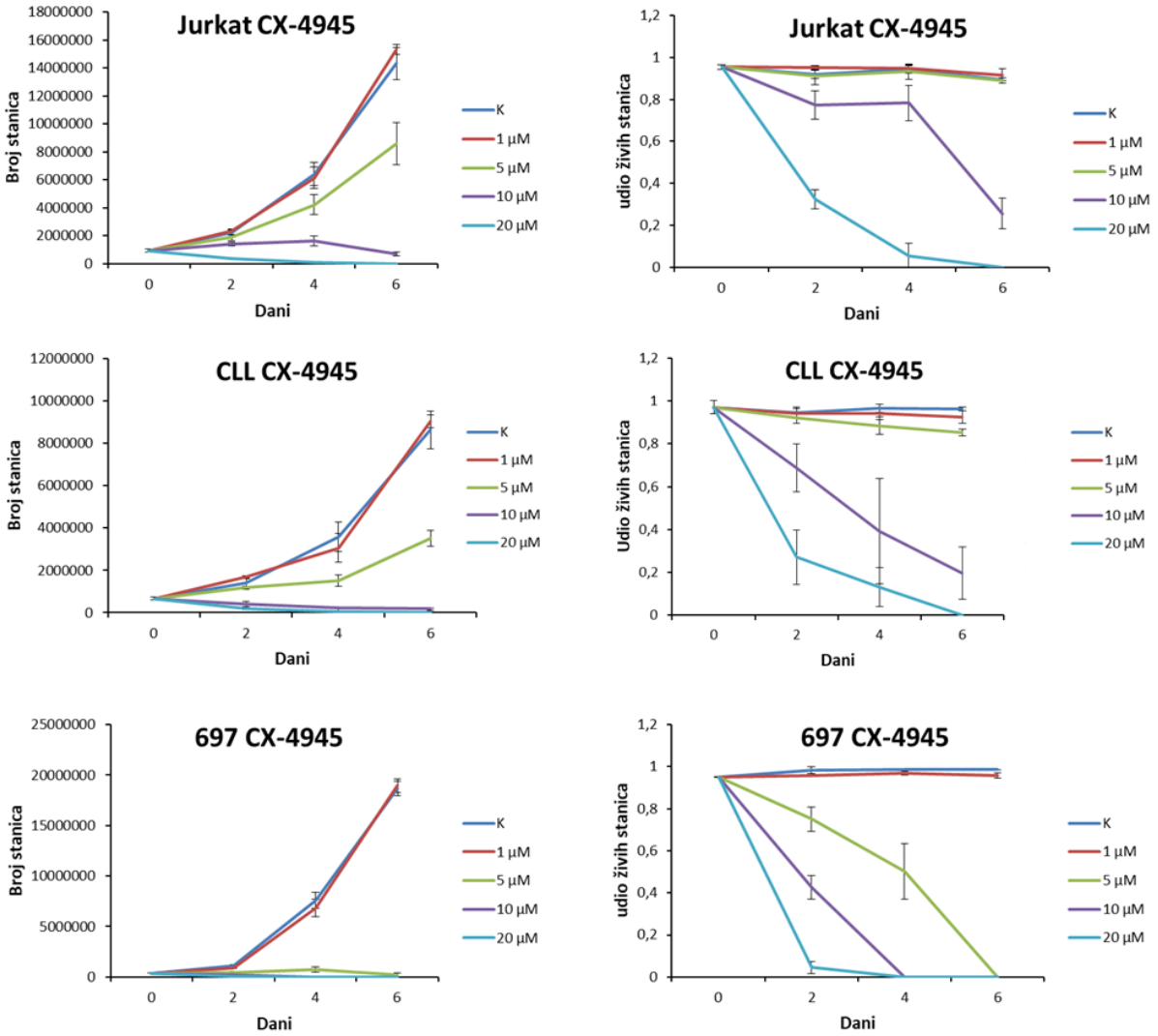


Slika 19. Analiza aktivnosti puta GSK3 (glikogen sintaza kinaza-3). pGSK α/β: fosforilirani oblik proteina; GSK β: ukupni proteini GSK β korišteni su kao mjera količine proteina.

4.5. Inhibicija kazein kinaze II

Kako su prethodna istraživanja pokazala značajne promjene u ekspresiji proteina porodice Ikaros u kontekstu puta Notch, istražen je utjecaj inhibitora kazein kinaze II (CK II), CX-4945 na modelne stanične linije. Naime, CK II može fosforilirati Ikaros i tako utjecati na njegovu biološku funkciju (Marke *i sur.*, 2018; Song *i sur.*, 2015). Kako bismo istražili učinke spoja CX-4945 kod staničnih linija Jurkat, CLL i 697 praćena je njihova proliferacija u prisutnosti različitih koncentracija inhibitora CX-4945. Iz proliferacijskih krivulja vidljivo je da je CX-4945 djelovao toksično na sve stanične linije u koncentracijama većim od 5 μM. Najosjetljivija je bila stanična linija 697 (Slika 20.).

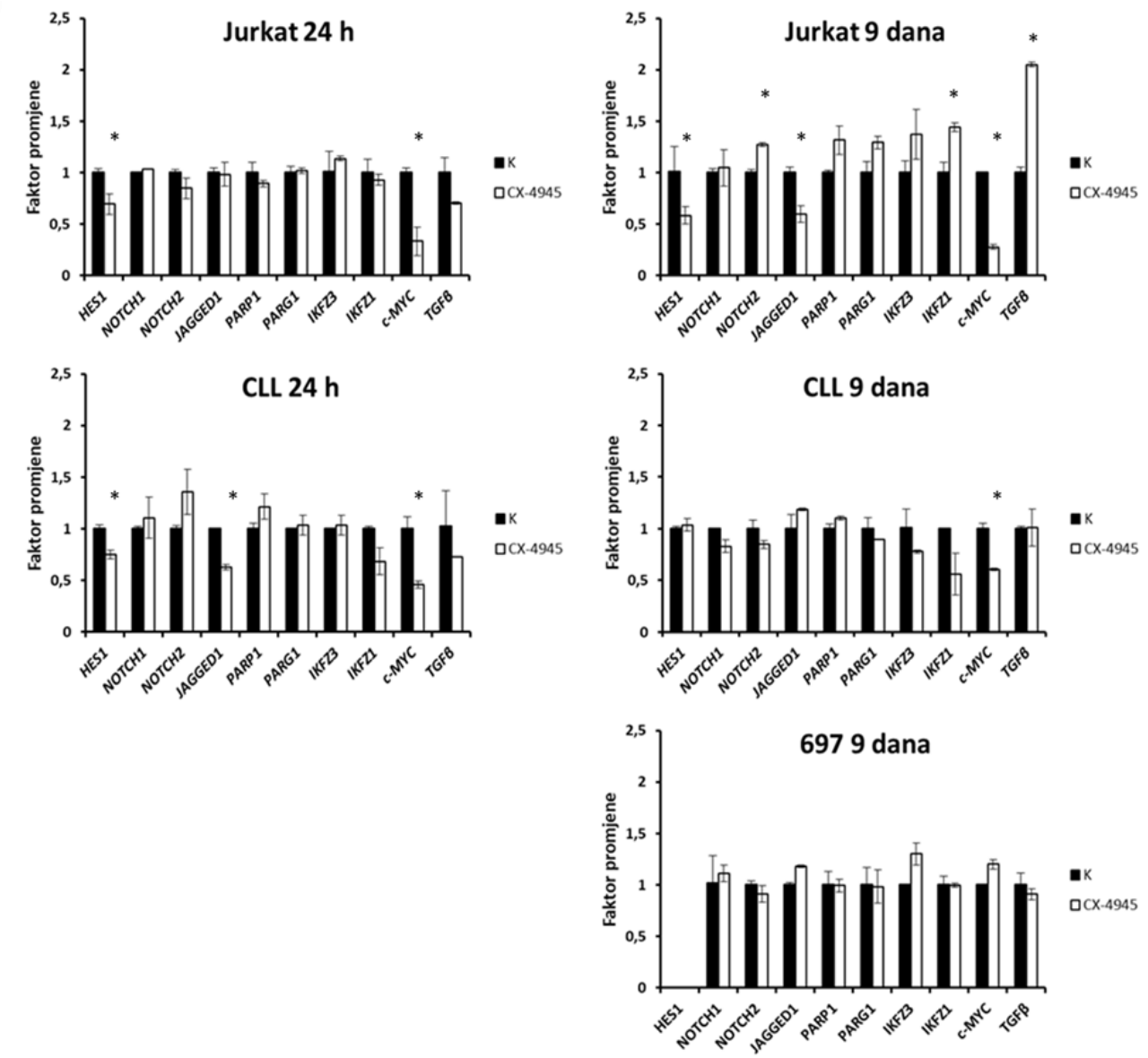
Nakon titracije odabrane su one koncentracije koje ne smanjuju vijabilnost, ali utječu na proliferaciju stanica (5 μM za stanice Jurkat, CLL i 2,5 μM za 697). Stanice su tretirane inhibitorom CX-4945 svaki drugi dan kroz 9 dana. Nakon 24 h i nakon 9 dana inhibicije CK II, metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, analizirana je ekspresija gena vezanih za putova Notch i PARP kod sve tri linije. Analizirani su geni za receptore *NOTCH1-2*, nizvodna meta puta Notch, *HES1*, *PARP1* i *PARG*. Također je istražena ekspresija *c-MYC*, kao pokazatelja stanične proliferacije, *TGFβ*, faktora rasta i tumorskog supresora, kao i transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros, *IKFZ1*, *IKFZ3*.



Slika 20. Krivulje proliferacije i vijabilnosti nakon tretmana inhibitorom CX-4945. Stanične linije Jurkat, 697 i CLL tretirane su inhibitorom kazein kinaze 2 (CX-4945) kroz 6 dana, svaki drugi dan. Ukupan broj stanica i udio živih stanica dobiveni su brojanjem stanica obojenih tripanskim modrilom pod svjetlosnim mikroskopom. C: kontrolne stanice; 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM: koncentracija dodanog inhibitora.

Analiza genske ekspresije (Slika 21.) pokazala je u staničnim linijama Jurkat i CLL smanjenje ekspresije gena *HES1* za ~ 25 % a *c-MYC* za ~ 55 % nakon 24 h. Nakon devetodnevnog tretmana stanična inhibicija ekspresije *HES1* iznosila je ~ 45 %, a *c-MYC-a ~ 80 %.* Također je došlo do smanjenja ekspresije *JAGGED1* i povećanja ekspresije gena *NOTCH2*, *IKFZ1* i *TGFβ*. Kod linije CLL nakon 9 dana tretmana zabilježeno je samo smanjenje ekspresije *c-MYC*-a za 40

%. Budući da linija 697 nema aktivan put Notch, napravljena je analiza ekspresije samo nakon 9 dana tretmana i nije zabilježena nikakva značajnija promjena.

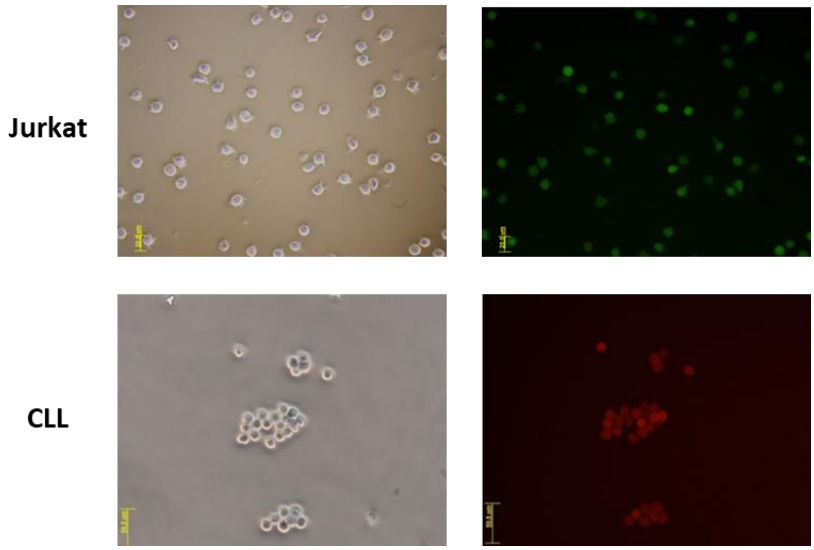


Slika 21. Analiza ekspresije gena u staničnih linija nakon tretmana inhibitorom CX-4945 tijekom 24 h i 9 dana. Stanice su tretirane inhibitorom kazein kinaze 2, CX-4945 svaki drugi dan kroz 9 dana. Nakon reverzne transkripcije izolirane RNA napravljena je analiza metodom qRT-PCR. Prikazani su reprezentativni rezultati triju nezavisnih eksperimenata. Relativna ekspresija prikazana je kao faktor promjene u usporedbi s vrijednostima kontrolnog uzorka. Kao endogena kontrola korištena je ekspresija gena *HPRT1*. C: kontrolne stanice, CX-4945: stanice

tretirane inhibitorom (5 μM za Jurkat i CLL stanice i 2,5 μM za 697); Statistička značajnost određena je studentovim T-testom: * p-vrijednost < 0,05.

4.6. Istraživanje utjecaja povećanja aktivnosti puta Notch i ekspresije PARP na biologiju stanica leukemije

Kako bismo istražili utjecaj pojačane ekspresije enzima PARP i kako bismo mogli aktivirati put Notch u staničnim linijama u kojima nije aktivan, stanične linije leukemija su transficirane ekspresijskim plazmidima koji sadrže slijed nukleotida koji kodiraju za protein PARP i aktivni fragment NICD. Kao kontrolni plazmidi korišteni su plazmidi koji nose slijed nukleotida koji kodiraju za zeleni fluorescentni protein (pGFP) ili crveni fluorescentni protein (pRFP) (Slika 22.). Nakon optimizacije uvjeta transfekcije i selekcije, uspješnom se pokazala samo transfekcija staničnih linija Jurkat i CLL. Metodom klonalne selekcije uzgojeni su pojedini klonovi transficiranih stanica. Stanične linije Nalm6 i 697 nije bilo moguće transficirati na sličan način.

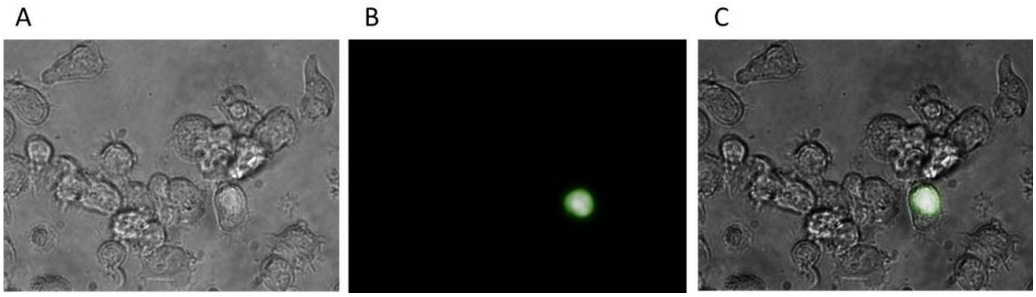


Slika 22. Stanične linije Jurkat i CLL nakon transfekcije i klonalne selekcije plazmidom koji nosi gen za zeleni fluorescentni protein (Jurkat) i crveni fluorescentni protein (CLL), snimljene pod fluorescencijskim mikroskopom.

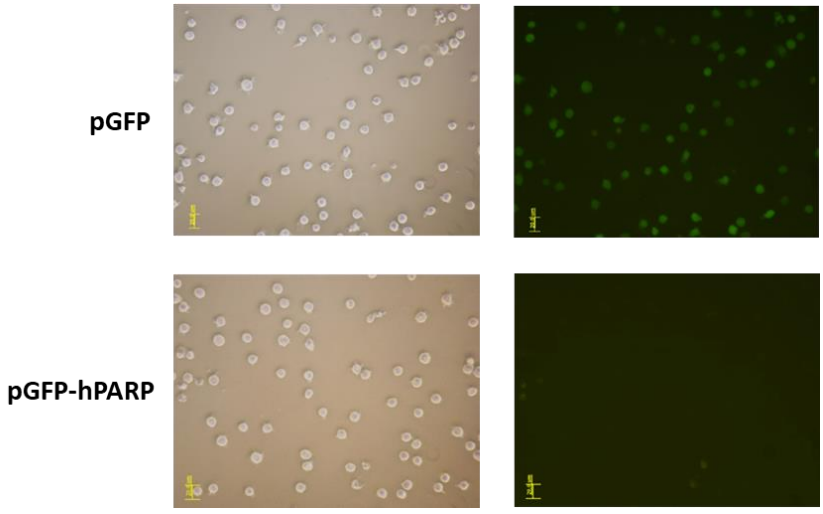
4.6.1. Analiza utjecaja povećanja ekspresije gena YY1 na signalne putove Notch i PARP

Kako bismo istražili utjecaj pojačane ekspresije enzima PARP, u stanice je unesen plazmid sa slijedom nukleotida koji kodiraju za protein PARP1 fuzioniran sa zelenim fluorescentim

proteinom (pGFP-hPARP, dar Valerie Schreiber, Strassbourg). Kao kontrolni plazmid korišten je plazmid pGFP, sa slijedom nukleotida koji kodiraju za zeleni fluorescentni protein. 48 h nakon transfekcije plazmidom pGFP-hPARP zeleni fluorescentni signal lociran je u jezgri limfocita, gdje je u stanici smješten protein PARP (Slika 23.). Nakon uspostave stabilnih klonova linije Jurkat (Slika 24.) prisutnost plazmida pGFP-hPARP potvrđena je reakcijom PCR (Slika 25.). Klonovi linija koji sadrže pGFP-hPARP izgubili su međutim zeleni fluorescentni signal, te je zaključeno da je došlo do utišavanja ekspresije transkripcije plazmida (Slika 24.). Stoga nije nastavljeno s daljnjom analizom.

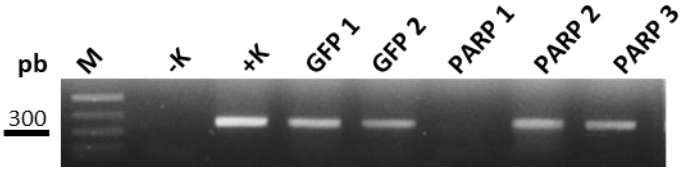


Slika 23. Stanična linija CLL 48 h nakon transfekcije plazmidom pGFP-hPARP. Stanice su transfecirane plazmidom koji kodira za fuzijski protein (pGFP-hPARP). Slike su snimljene pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX51) pod povećanjem 200 puta A: slika pod vidljivim svjetlom; B: slika pod UV svjetlom; C: preklopljene slike A i B



Slika 24. Stanična linija Jurkat nakon transfekcije plazmidima koji kodiraju zeleni fluorescenti protein i fuzijski protein PARP. Stanice su transficirane plazmidom koji nosi

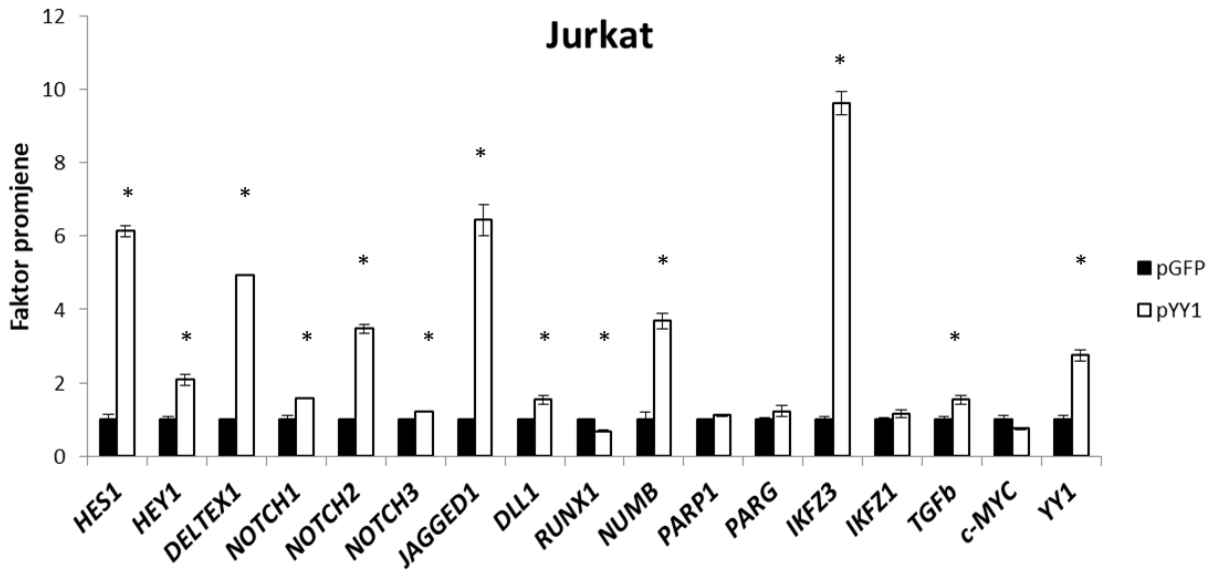
slijed nukleotida koji kodiraju za zeleni fluorescentni protein (pGFP) i plazmidom koji nosi slijed nuleotida za fuzijski protein (pGFP-hPARP). Nakon selekcije antibiotikom G418, uzgojeni su pojedinačni stabilni klonovi.



Slika 25. Analiza prisutnosti ugrađenog slijeda nukleotida u DNA transficiranih plazmida u klonovima stanica Jurkat. Nakon transfekcije plazmidima pGFP i pGFP-hPARP i klonalne selekcije izolirana je DNA iz nekoliko klonova stanične linije Jurkat. DNA je analizirana reakcijom PCR. Početnice su dizajnirane tako da umnažaju slijed nukleotida za GFP s plazmida. M: standard veličine DNA, -K: negativna kontrola (DNA netransficiranih stanica), +K: pozitivna kontrola s plazmidom koji nosi slijed nukleotida za GFP; GFP1, GFP2: klonovi stanične linije Jurkat nakon transfekcije plazmidom pGFP; PARP1, PARP2, PARP3: klonovi stanične linije Jurkat nakon transfekcije plazmidom pGFP-hPARP1.

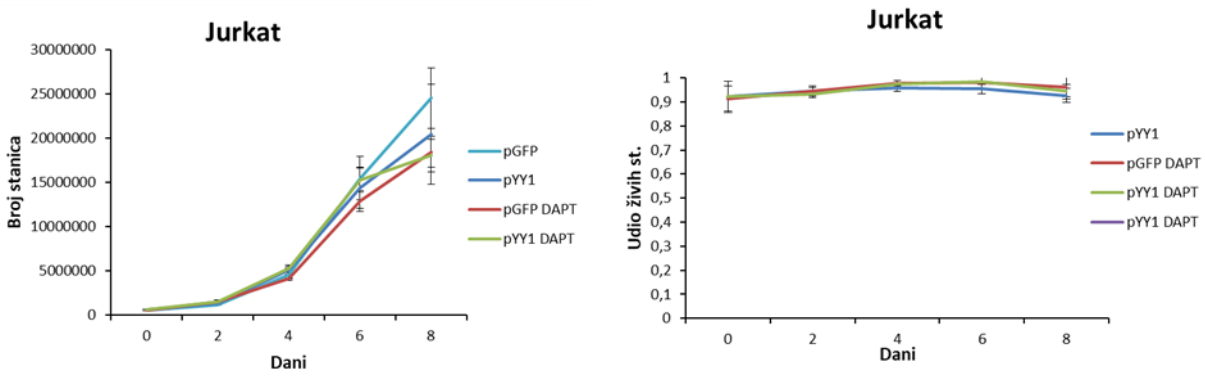
4.6.2. Analiza utjecaja povećanja ekspresije gena YY1 na signalne putove Notch i PARP

Kako je promotor gena PARP1 (Doetsch *i sur.*, 2012) reguliran proteinom YY1, a protein YY1 može mijenjati svoju aktivnost u ovisnosti o djelovanju PARP-a, pokušalo se promijeniti ekspresiju PARP-a povećanjem ekspresije YY1. Stanice Jurkat transficirane su plazmidom koji sadrži slijed nukleotida za gen *YY1* (pYY1, dar Bernharda Lüschera Institut za biokemiju i molekularnu biologiju, Aachen, Njemačka). Nakon selekcije uzgojeni su pojedinačni klonovi. Analizom ekspresije YY1 na razini RNA pokazalo se povećanje od 2.7 puta u odnosu na stanice transficirane kontrolnim plazmidom. Analiza ekspresije panela gena vezanih uz signalni put Notch i PARP pokazala je promjene u ekspresiji niza gena: IKFZ3 (9,6 puta), HES1 (6,1 puta), JAGGED1 (6,4 puta), HEY1 (2 puta), DELTEX (5 puta), NOTCH1 (1,5 puta), NOTCH2 (3,4 puta), NOTCH3 (1,2 puta), DLL1 (1,5 puta), NUMB (3,7 puta). Ekspresija gena RUNX1 bila je smanjena za 32 %. Ekspresija Ikarosa, c-MYC, te PARP1 i PARG nije bila značajno promijenjena.



Slika 26. Analiza ekspresije panela gena vezanih uz signalni put Notch i PARP linije Jurkat s povećanom ekspresijom gena YY1. Stanice Jurkat transficirane su plazmidom koji sadrži slijed nukleotida koji kodiraju za protein YY1 (pYY1). RNA je izolirana iz stabilno transfeciranih stanica plazmidima pYY1 i pGFP i nakon reverzne transkripcije analizirana metodom qPCR. Kao endogena kontrola korištena je ekspresija gena *HPRT1*; pGFP: stanice transficirane plazmidom koji sadrži slijed nukleotida koji kodiraju za zeleni fluorescentni protein; pYY1: stanice transficirane plazmidom koji sadrži slijed nukleotida koji kodiraju za protein YY1. Statistička značajnost određena je studentovim T-testom: * p-vrijednost < 0,05.

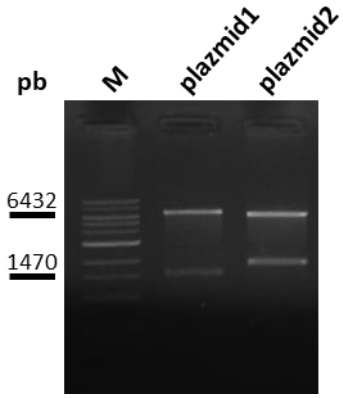
Klonovi s povećanom ekspresijom YY1 također su uspoređeni s kontrolnom staničnom linijom s obzirom na vijabilnost i sposobnost proliferacije. Proliferacija i vijabilnost stanica koje sadrže pYY1 nije bila promijenjena u odnosu na kontrolne stanice (Slika 27.). Budući da YY1 sudjeluje u regulaciji putova Notch, kao što je pokazao i porast ekspresije *HES1* i *JAGGED1*, praćena je stanična proliferacija u prisutnosti inhibitora DAPT. Nije bilo bitnih razlika u vijabilnosti i proliferaciji stanica u odnosu na kontrolu.



Slika 27. Krivulje proliferacije i vijabilnosti linije Jurkat s povećanom ekspresijom YY1. Stanice Jurkat su transficirane plazmidom pYY1. Uzgojeni su stabilni klonovi. Dio kultura je tretiran inhibitorom DAPT (20 μM) svaki drugi dan. Stanice su brojane svaki drugi dan. pGFP: stanice transficirane plazmidom koji sadrži slijed nukleotida koji kodiraju za zeleni fluorescentni protein; pYY1: stanice transficirane plazmidom koji sadrži slijed nukleotida koji kodiraju za protein YY1.

4.6.3. Analiza utjecaja unosa plazmida sa slijedom nukleotida koji kodira za protein NICD na leukemijske stanične linije

Usporedno s eksperimentima kojima je bio cilj povećati djelovanje proteina PARP1, pokušali smo povećati i aktivnost puta Notch u modelnim staničnim linijama. Jedna od mogućnosti je bio unos plazmida koji bi kodirao intracelularnu domenu proteina NOTCH1 (NICD1) čija bi ekspresija simulirala konstitutivno aktivni receptor. Fragment NICD1 umnožen je s plazmida pJT111 (dar Paula Dalling Linga, Houston). Dobiveni produkt kloniran je u vektor pCDNA3, a ispravnost kloniranja provjerena je pomoću restrikcijskih endonukleaza (Slika 30.) i sekvenciranjem. Međutim, stanične linije koje nemaju aktivan put Notch, (697 i Nalm6) bile su refraktorne na postupke transfekcije.



Slika 30. Restrikcijska digestija plazmida pNICD nakon ugradnje fragmenta NICD u plazmid pCDNA3. Ligacijom fragmenta pročišćenog iz gela s lineariziranim plazmidom pcDNA3 dobiven je plazmid kojim su transformirane bakterije *E. coli*. Iz selektiranih kolonija izoliran je plazmid i cijepan s enzimima EcoRI i NdeI, kako bi se utvrdila ispravnost orijentacije fragmenta u plazmidu. Ispravna orijentacija daje fragmente od 6432 pb i 1470 pb. M: 1 kb DNA Marker (New England Biolabs); plazmid1 i plazmid2: dvije varijante plazmida pCDNA3-hNICD1.

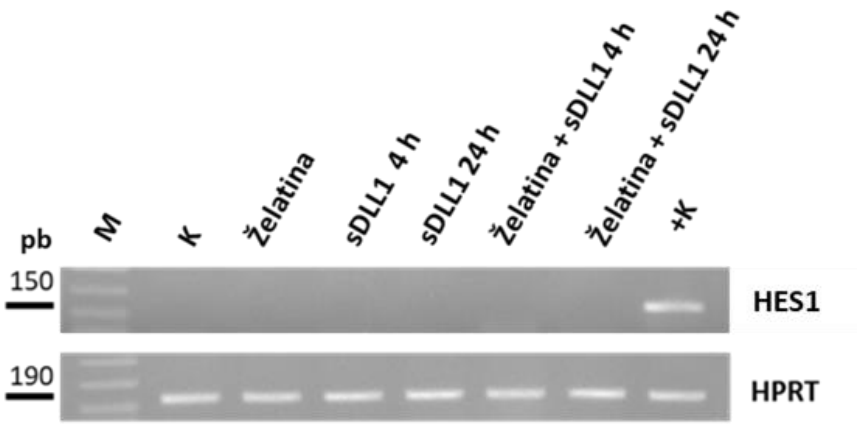
4.7. Aktivacija puta Notch ekstracelularnim ligandom

Kako bismo promatrali utjecaj puta Notch u stanicama limfocita pre-B u kojima nije aktivan (697 i Nalm6), a kako su se stanice pokazale otporne na unos plazmida transfekcijom, pokušalo se aktivirati put aktivacijom receptora Notch ekstracelularnim ligandom.

4.7.1.Djelovanje proteina DLL1 na signalizaciju

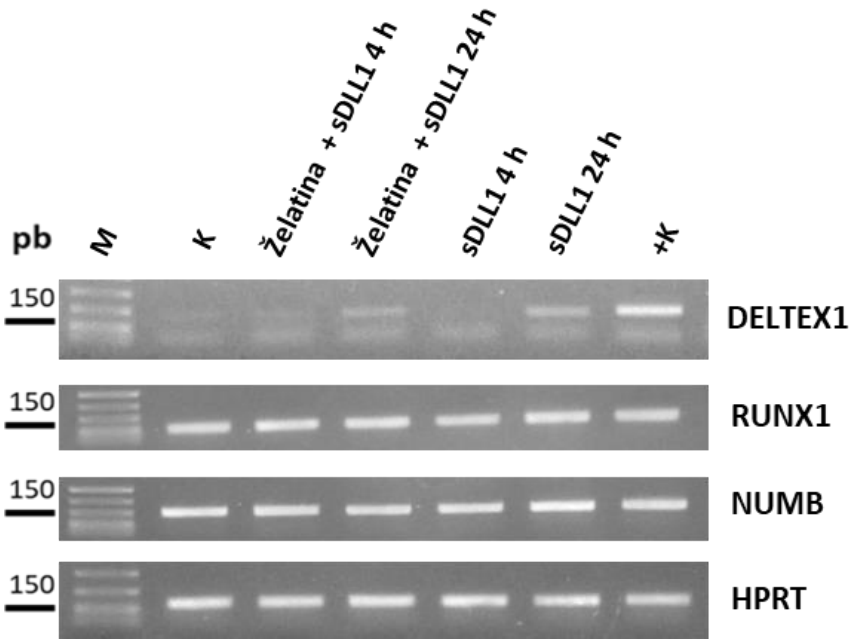
Rekombinantni protein DLL1 otopljen u mediju aktivirao je signalni put Notch u nekim tipovima stanica (Lee *i sur.*, 2013; Tsao *i sur.*, 2011). Prijašnjom karakterizacijom linije 697 pokazali smo da ona sadrži receptore NOTCH1 i NOTCH2 te da signalni put nije aktivan. Stoga smo stanice 697 tretirali proteinom DLL1 na dva načina. U jednu smo kulturu dodali protein otopljen u mediju, u koncentraciji 1 µg/ml, te nakon 4 i 24 sata izolirali RNA i nakon reverzne transkripcije analizirali ekspresiju nizvodne mete puta Notch, *HES1*. Budući da postoje hipoteze da je za aktivaciju receptora Notch putem liganda potrebna imobilizacija liganda na podlozi (Ju *i sur.*, 2004; Zolkiewska, 2008), uklopili smo solubilni protein DLL1 u želatinu i na takvu podlogu nasadili stanice. Stanice su također inkubirane 4 i 24 sata, kad je izolirana RNA i analizirana

ekspresija gena *HES1*. Rezultati su pokazali da niti jedan od pristupa nije doveo do transkripcije nizvodne mete *HES1* (Slika 28.).



Slika 28. Analiza aktivnosti puta Notch nakon tretmana stanica 697 proteinom DLL1. Stanice 697 tretirane su proteinom DLL1 otopljenim u mediju (1µg/ml) ili su nasađene na podlogu od želatine s uklopljenim proteinom DLL, te inkubirane 4 i 24 sata. cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA iz stanica analizirana je reakcijom PCR s početnicama za gen *HES1*. M: PCR marker (New England Biolabs); K: netretirane stanice; Želatina: stanice uzgajane samo na sloju želatine; želatina: stanice 697 na želatini; sDLL1 4h: stanice 697 s dodanim proteinom DLL1 nakon 4h; sDLL1 24: stanice 697 s dodanim proteinom DLL1 nakon 24h; želatina + sDLL1 4h: stanice 697 na želatini s uklopljenim proteinom DLL1 nakon 4h; želatina + sDLL1 24h: stanice 697 na želatini s uklopljenim proteinom DLL1 nakon 24h; +K: stanice s aktivnim putem Notch (Jurkat).

Da bismo pokušali utvrditi imaju li stanice mehanizme koji sprječavaju aktivaciju puta Notch ili prisutnost otopljenog liganda nije dovoljna za aktivaciju receptora, analizirali smo ekspresiju nekoliko negativnih regulatora puta Notch, *DELTEX1*, *RUNX1* i *NUMB*. *RUNX1* i *NUMB* su kod svih stanica bili jako eksprimirani, dok je ekspresija *DELTEX1* pokazala blago povećanje nakon tretmana s ligandom DLL1 kroz 24 sata.

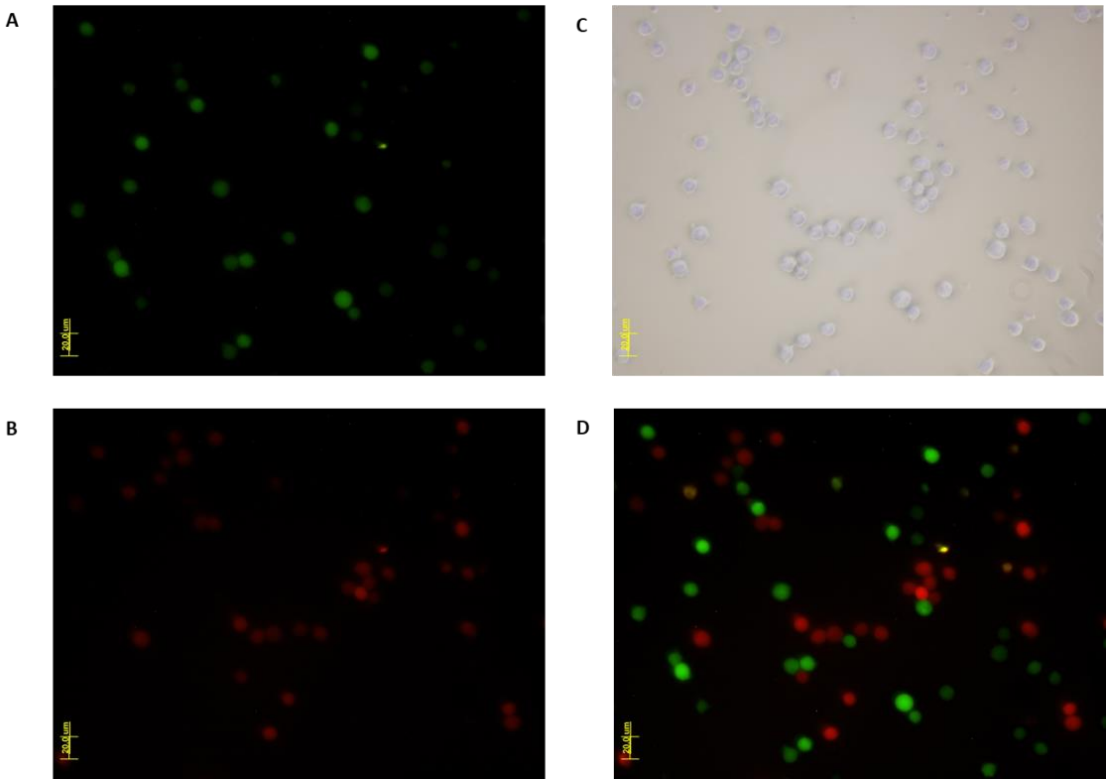


Slika 29. Analiza regulatora puta Notch nakon tretmana proteinom DLL1. Stanice 697 tretirane su proteinom DLL otopljenim u mediju (1µg/ml) ili su nasađene na podlogu od želatine s uklopljenim proteinom DLL, te inkubirane 4 i 24 sata. cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA iz stanica analizirana je reakcijom PCR s početnicama za gene *DELTEX1*, *RUNX1*, *NUMB* te *HPRT1*. M: PCR marker (New England Biolabs); K: netretirane stanice; Želatina: stanice uzgajane samo na sloju želatine; K: netretirane stanice; Želatina: stanice uzgajane samo na sloju želatine; želatina: stanice 697 na želatini; sDLL1 4h: stanice 697 s dodanim proteinom DLL1 nakon 4h; sDLL1 24: stanice 697 s dodanim proteinom DLL1 nakon 24h; želatina + sDLL1 4h: stanice 697 na želatini s uklopljenim proteinom DLL1 nakon 4h; želatina + sDLL1 24h: stanice 697 na želatini s uklopljenim proteinom DLL1 nakon 24h; +K: stanice s aktivnim putem Notch (Jurkat).

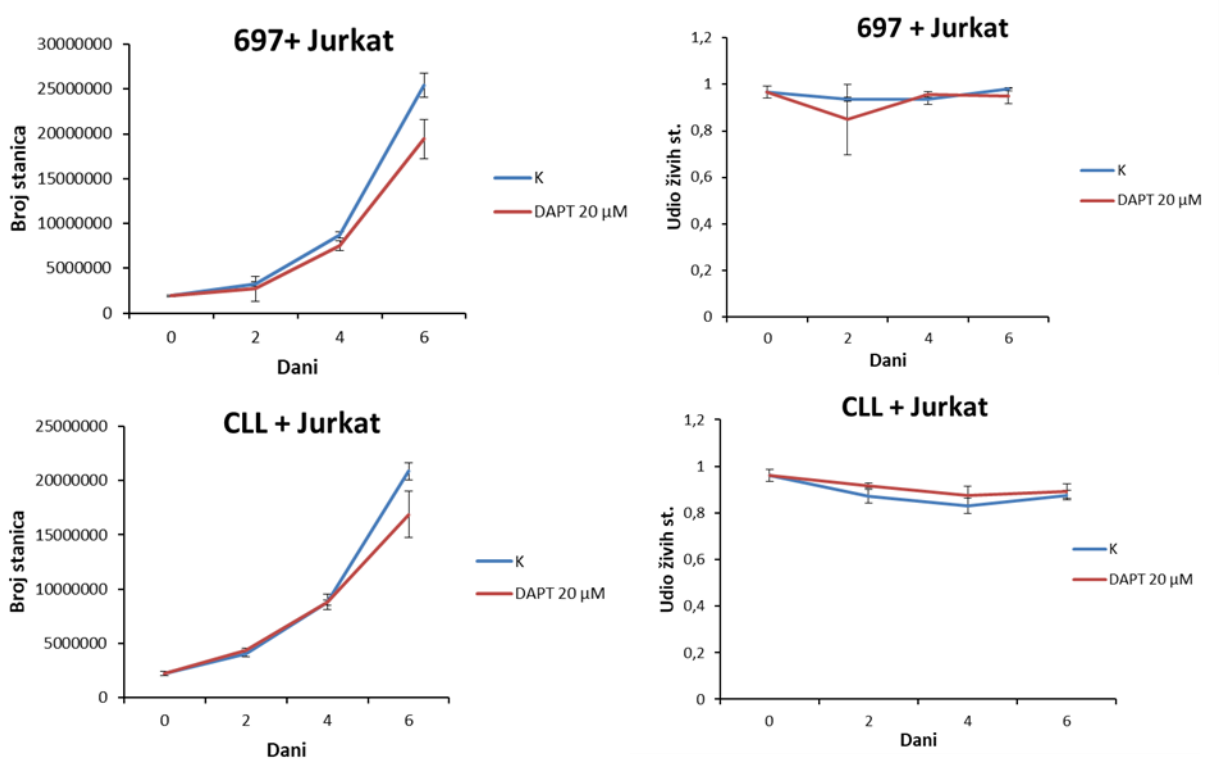
4.7.2. Analiza aktivacije puta Notch uzgojem limfocita u kokulturi sa stanicama koje eksprimiraju ligande

Pretpostavili smo da bi najbolji način prezentiranja liganda stanicama bio uzgoj stanica u kokulturi s drugom linijom koja ga eksprimira. Karakterizacija linija pokazala je da stanice Jurkat izražavaju ligande DLL1 i JAGGED1. Tako su stanice CLL i 697 uzgajane u kokulturi sa stanicama 697 (Slika 31.).

Stanice CLL i 697 su nasađene u omjeru 1:1 i uzgajane kroz 6 dana, uz dohranjivanje po potrebi. Jedna kultura je tretirana inhibitorom DAPT (20 μM), da bi se ispitala specifičnost djelovanja na put Notch. Da bismo mogli razlikovati stanične linije, korištene su stanice Jurkat prethodno transficirane plazmidom pGFP koje su fluorescirale zeleno, i stanice CLL transficirane plazmidom pRFP koje su fluorescirale crveno. Praćena je proliferacija i vijabilnost stanica u kokulturi. Svaki drugi dan brojale su se sve stanice, a bojanjem s tripanskim modrilom određena im je vijabilnost. Obje kokulture stanica 697 i CLL pokazale su eksponencijalan porast broja stanica i visoku razinu vijabilnosti kroz svih 6 dana, usporedivu s rastom pojedinačnih kultura (Slika 32.). Kokulture stanica tretiranih inhibitorom DAPT šesti dan su pokazale je usporavanje proliferacije u odnosu na netretirane. Na razini vijabilnosti nije bilo razlike.



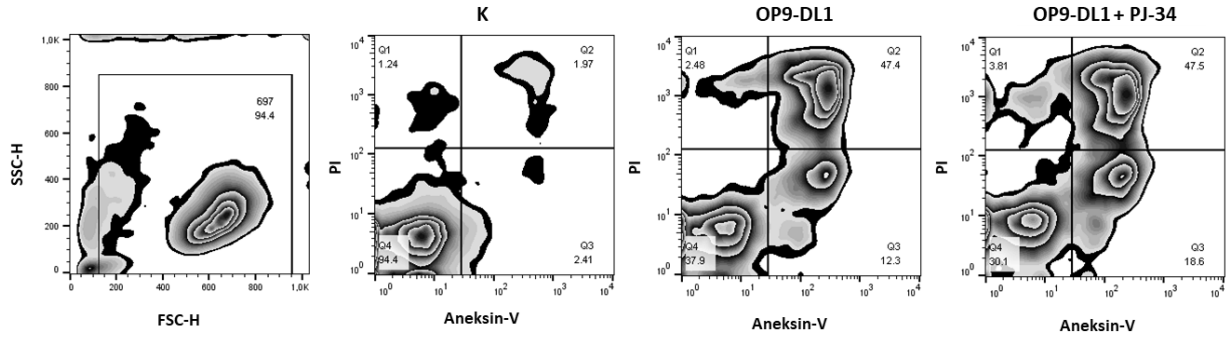
Slika 31. Kokultura staničnih linija Jurkat-GFP i CLL-RFP. A: Kokultura stanica snimljena pod fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX51; povećanje 100 puta) s filterom za GFP; B: kokultura stanica pod fluorescencijskim mikroskopom filterom za RFP; C: Kokultura stanica pod vidljivom svjetlosti; D: preklop fotografije A i B..



Slika 32. Krivulje proliferacije i vijabilnosti kokulture stanične linije Jurakt s linijama CLL i 697. Stanice Jurkat i 697 te Jurkat i CLL nasađene su u omjeru 1:1 te uzgajane kroz 6 dana u prisutnosti ili odsutnosti inhibitora DAPT. Stanice su brojane pod mikroskopom svaki drugi dan, a vijabilnost je određena bojanjem s tripanskim modrilom. K: kokultura bez inhibitora DAPT; DAPT: kokultura s inhibitorom DAPT (20 µM).

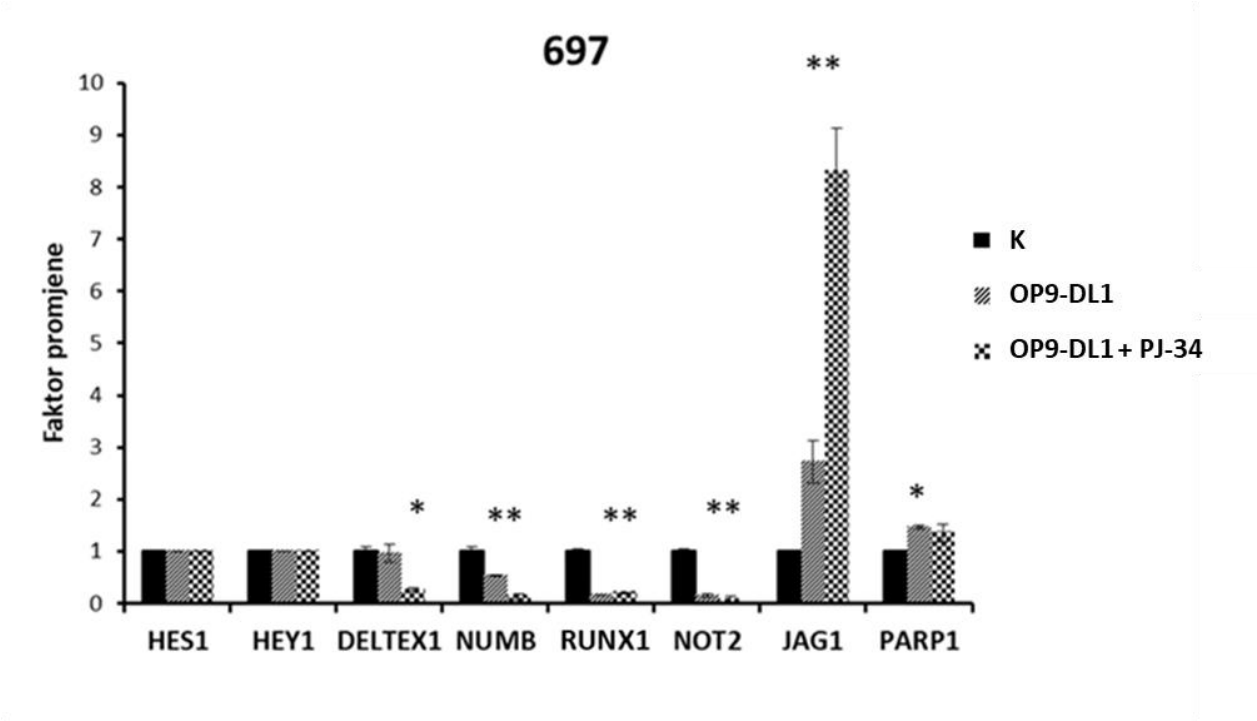
Schmitt i Zúñiga-Pflücker opisali su uzgoj i diferencijaciju hematopoetskih stanica na stanicama hranilicama OP9-DL1. To su mišje stromalne stanice koje eksprimiraju ljudski DLL1 (OP9-DL1) (Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002). Takve su stanice upotrijebljene za uzgoj stanica 697 u kokulturi. Usporedno su stanice uzgajane i u prisutnosti inhibitora PJ-34. Stanice su uzgajane kroz 7 dana, kad su analizirane na protočnom citometru i sortirane prema intenzitetu fluorescencije zelenog fluorescentnog proteina, budući da ga stanice OP9-DL1 eksprimiraju. Kod stanica 697 ispitana je pojava apoptoze usporednim bojanjem s propidij jodidom i obilježavanjem aneksinom te sortiranjem stanica protočnim citometrom. Rezultati prikazani na slici 33. pokazuju da su stanice uzgajane na hranidbenoj podlozi s ligandom DLL1 imale povećanje broja apoptotskih stanica. Dok je kod kontrole, u prosjeku, samo 2 % bilo pozitivno i na aneksin i na propidij jodid, što su obilježja stanica u kasnoj apoptozi, kod stanica u kokulturi bilo ih je 47 %.

Najveća je letalnost bila kod stanica tretiranih inhibitorom PJ-34 , gdje je udio vijabilnih stanica iznosio 31,2 %.



Slika 33. Analiza apoptoze protočnom citometrijom nakon kokultivacije stanica 697 na stanicama hranilicama OP9-DL1. Stanice su nasađene na stanice hranilice u omjeru 1:1 i uzgajane kroz 7 dana. Kao kontrola su uzgajane stanice u suspenziji. Jednoj kokulturi dodan je inhibitor PJ-34 (20 μM). Stanice 697 su sortirane na osnovi prisustva zelenog fluorescencijskog signala stanica OP9-DL1. Apoptotske stanice su detektirane prema prisutnosti fluorescencije aneksina V i propidij jodida. Stanice su analizirane na protočnom citometru u programu FlowJo. K: stanice 697; OP9-DL1: kokultura stanica 697 na hranidbenoj podlozi OP9-DL1; OP9-DL1 + PJ-34: kokultura stanica 697 na hranidbenoj podlozi OP9-DL1 uz prisustvo inhibitora PJ-34.

Iz stanica sortiranih protočnim citometrom izolirana je RNA, reverzno prepisana u cDNA te zatim ispitana ekspresija seta gena povezanih s putem Notch reakcijom PCR u stvarnom vremenu (Slika 34.). Analizirana je ekspresija gena *HES1*, *HEY1*, *DELTEX*, *NUMB*, *RUNX1*, *NOTCH1*, *JAGGED1* i *PARP1*. Razina ekspresije gena *HES1* i *HEY1* kod stanica 697 uzgajanih na stanicama OP9-DL1 nije se promijenila u odnosu na kontrolne stanice uzgajane bez hranidbenog sloja. Ekspresija gena *NUMB, RUNX1* i *NOTCH2* je bila smanjena. Kod kultura kojima je dodan inhibitor PARP-a također je smanjena ekspresija gena *NUMB, RUNX1* i *NOTCH2*, ali i *DELTEX1*. Ekspresija gena *JAGGED1* u skupini s inhibitorom povećana je 8 puta (Slika 34.).



Slika 34. Analiza genske ekspresije stanica 697 nakon kokultivacije na stanicama hranilicama OP9-DL1. Stanice su nasađene u omjeru 1:1 i uzgajane kroz 7 dana. Tada su stanične populacije razdvojene protočnim citometrom, izolirana je RNA i dobivena cDNA analizirana reakcijom PCR u stvarnom vremenu. Kao endogena kontrola korištena je ekspresija gena *HPRT1*; Statistička značajnost određena je studentovim T-testom: * p-vrijednost < 0,05. K: stanice 697; OP9-DL1: kokultura stanica 697 na hranidbenoj podlozi OP9-DL1; OP9-DL1 + PJ-34: kokultura stanica 697 na hranidbenoj podlozi OP9-DL1 uz prisustvo inhibitora PJ-34; NOT2: Notch2; JAG1: Jagged1.

5. RASPRAVA

U ovom se radu pokušalo odgovoriti na pitanje kakva je povezanost signalnog puta Notch i enzima PARP u različitim leukemijskim linijama, te kakva je njihova uloga u staničnim procesima poput proliferacije, diferencijacije i tumorigeneze. Objašnjenje tih procesa i uloge ovih putova omogućile bi bolje razumijevanje nastanka i tijeka bolesti, kao i razvoj specifičnije terapije s boljim ishodima.

Istraživanje je započelo karakterizacijom seta gena koje eksprimiraju stanične linije uzgojene iz leukemijskih stanica, a koje su predstavljale različite tipove malignih limfocita. Osim na razini ekspresije gena, analizirana je i ekspresija proteina putova Notch i PARP. U daljnjim eksperimentima pratila se stanična reakcija na direktnu ili indirektnu inhibiciju ovih putova, te se pokušalo aktivirati put Notch kod stanica kod kojih je ovo signaliziranje utišano.

Metoda višestruke analize ekspresije RNA iz malog broja stanica

Stanice leukemija analizirane su pomoću dvije metode: klasičnim qRT-PCR učinjenim na cDNA dobivenom nakon izolacije ukupne RNA i višestrukom reverznom transkripcijom iz lizata malog broja stanica (50-2500 stanica). Druga metoda potvrdila je rezultate dobivene klasičnom metodom. Ta je metoda optimizirana kako bi mogla služiti kao brzi protokol za otkrivanje ekspresije ključnih gena iz uzoraka s malim brojem stanica. Izvorno je ova metoda korištena za analizu pojedinačnih stanica (Peixoto *i sur.,* 2004). Naime, razvoj novih tehnologija omogućio je znanstvenicima analizu ekspresije RNA na razini jedne stanice, pa čak i mogućnost detektiranja prisutnosti samo dvije molekule DNA. Ove metode vrijedne su kada je dostupna samo jedna stanica ili mali broj stanica, kao što je slučaj kod ranih embrionalnih stanica ili matičnih stanica. Također ovaj pristup omogućuje analizu razlika između stanica u staničnoj populaciji. Ta vrsta analize učinjena je u nekoliko studija, gdje se ukazuje na postojanje varijabilnosti između profila ekspresije gena u populaciji stanica istog tipa (Boudil *i sur.*, 2013). Istovremeno, ove tehnike zahtijevaju velik broj validacija jer rezultirajuće vrijednosti potječu od jedine stanice, a samo pouzdani rezultati mogu ukazati na razlike između entiteta. Varijabilnost u genskoj ekspresiji između pojedinih stanica izbjegava se istovremenom analizom više stotina pojedinačnih stanica (Peixoto *i sur.*, 2004). I najizvedeniji oblici analize na razini jedne stanice (poput sekvenciranja transkriptoma jedne stanice pomoću tehnologije mikrofluida (*Pellegrino i sur*., 2018)) još uvijek ukazuju na probleme poput nekoleracije između transkriptoma i proteoma a također i stanice za

takve analize moraju biti vijabilne pa prikupljanje stanica iz pacijenata mora biti dobro koordinirano.

Prema našim rezultatima pokazalo se da je metoda višestruke direktne analize genske ekspresije iz malog broja stanica osjetljiva i da su dobiveni rezultati u skladu s klasičnim metodama koje uključuju korak izolacije RNA, kao i s rezultatima dobivenih analizom proteina. Prva prednost optimizirane metode jest izbjegavanje izolacije RNA. Nadalje, višestruka reakcija PCR omogućuje amplifikaciju rijetkih sljedova nukleotida, izbjegavajući njihov gubitak. Male razlike koje se pojavljuju u razini ekspresije između uzoraka dobivenih na različite načine vjerojatno proizlaze iz dvostupanjske reakcije PCR primijenjene u izravnoj analizi. Razlike se također javljaju kada se primjenjuju različiti tipovi reverzne transkripcije, npr. ovisno o upotrijebljenim početnicama (nasumični heksameri, specifični primeri ili oligo dT) (podaci nisu prikazani).

Treba naglasiti da je dizajn početnica najkritičniji korak. Iako je efikasnost svih parova početnica provjerena, još uvijek je moguće da postoje male razlike. S druge strane, moguće je da prisutnost drugih komponenti staničnog lizata utječe na rezultate. Ipak, relativni omjer ekspresije gena u višestrukoj reakciji sačuvan je u usporedbi s rezultatima dobivenih iz cDNA. Prednosti su ove metode mogućnost korištenja malog broja stanica, jednostavna priprema uzorka, izravni pristup i simultana analiza željenog skupa gena. Također, u kombinaciji sa staničnim sortiranjem omogućuje analizu malih populacija stanica (npr. matičnih stanica). Ova svojstva su važna u uvjetima kad je dostupan samo mali broj stanica, poput pojedinih bioloških uzoraka, kao i kad su potrebne jednostavne i brze metode dijagnoze. Rezultati o statusu signalizacije putem Notch u uzorcima leukemije mogu doprinijeti učinkovitoj i personaliziranoj terapiji u budućnosti.

Karakterizacija ekspresije leukemijskih staničnih linija

697 i Nalm6 stanične su linije dobivene iz limfocita pre-B koje pokazuju tipičnu ekspresiju gena loze limfocita B: prisutnost *PAX5*, *PU.1* (kod linije Nalm6), kao i odsutnost aktivnog puta Notch, što je pokazano prisustvom represije ekspresije nizvodnih ciljeva puta Notch, gena iz porodice *HES* i *HEY*. Ove stanice eksprimiraju Notch receptore, s *NOTCH2* kao dominantnim oblikom. Linija 697 također ima eksprimiran i ligand *JAGGED1*. Neaktivnost puta Notch također je potvrđena na razini proteina. Analiza limfocita B tijekom razvoja, općenito, pokazuje nisku aktivnost Notch signalizacije, iako je utvrđeno da put Notch ima ulogu u diferencijaciji limfocita B marginalne zone (Koyanagi *i sur.*, 2012).

Stanična linija porijeklom iz stanica kronične limfocitne leukemije limfocita B, CLL, pokazala je međutim, uz ekspresiju receptora *NOTCH1* i *2* i niske razine liganada *JAGGED1*, te ekspresiju svih nizvodnih meta puta Notch koji su analizirani, što ukazuje na aktivnost nizvodne signalizacije. Protein HES1 detektiran je i na razini proteina. Nedavno je ustanovljeno da u podskupu kroničnih limfocitnih leukemija, mutacija PEST domene receptora NOTCH1 povećava poluživot Notch-a i pridonosi agresivnosti bolesti (Gianfelici, 2012). Međutim, u stanicama CLL nije detektirana prisutnost aktivnog pocijepanog oblika receptora NOTCH1, NICD. Prisutnost nizvodnih meta puta Notch potakla nas je da istražimo prirodu ove osobine. Kao i velik broj staničnih linija limfocita B, ove stanice imortalizirane su Epstein Barrovim virusom (Hertlein *i sur.*, 2013). Njegov protein EBNA2 ima sposobnost vezanja na iste sljedove nukleotida u promotorima kao i NICD (Henkel *i sur.*, 1994; Strobl *i sur.*, 1997). Zbog te činjenice stanična linija CLL testirana je na prisutnost EBNA2, čija je ekspresija potvrđena i vjerojatno odgovorna za aktivaciju gena koji su inače mete molekule NICD, nastao aktivacijom receptora. Također je zanimljivo zamijetiti da je kod stanične linije CLL značajno smanjena ekspresija gena RUNX1, što je vjerojatno povezano s povećanom ekspresijom antigena EBNA2. Pokazano je da transkripcijski faktor EBNA2 aktivira transkripciju gena RUNX3 što ima za posljedicu represiju promotora RUNX1 (Gunnell *i sur.*, 2016). RUNX1 je transkripcijski faktor bitan u regulaciji hematopoeze i njegove distrupancije povezane su s mnogim poremećajima, a često mu se pripisuje i uloga tumorskog supresora (Jenkins *i sur.*, 2012).

Analiza stanične linije Jurkat, podrijetlom iz akutne leukemije limfocita T, pokazala je aktivnu signalizaciju puta Notch na razini RNA i proteina. Iz literature je poznato da stanice linije Jurkat imaju mutaciju receptora NOTCH1 koja omogućuje njegovu konstantnu aktivaciju (Sulis *i sur.*, 2008). Ovi podaci u skladu su s poznatom ulogom Notch-a u diferencijaciji limfocita T. Povećana i stalna signalizacija putem Notch povezana je s razvojem malignih tumora limfocita T (Weng *i sur.*, 2004).

Linije koje pokazuju eksprimirane nizvodne elemente puta Notch, Jurkat i CLL, također imaju i veću ekspresiju gena *NUMB*, čija je primarna uloga inhibicija puta Notch (Giebel *i* Wodarz, 2012; Katoh *i* Katoh, 2006).

Transkripcijski faktori iz porodice Ikaros, *IKFZ1* i *IKFZ3*, bili su značajno eksprimirani u svim linijama, iako je njihova razina ekspresije varirala u vremenu (osobito IKFZ3), čemu je uzrok vjerojatno varijacija uvjeta uzgoja (gustoća stanica, broj pasaže, sastav seruma…). Zamjetno

veću ekspresiju *IKFZ1* imale su stanice Jurkat, što je vjerojatno posljedica drugačije stanične loze (limfociti T) (Kastner *i* Chan, 2011).

Analiza ekspresije na razini RNA, enzima PARP1, bila je značajna, podjednaka i varijabilna u vremenu kod sve četiri stanične linije, dok je analiza na razini proteina pokazala povećan sadržaj proteina PARP1 u stanicama porijetlom iz limfocita pre-B. Mogući uzrok tome je da je PARP važan faktor u preživljavanju stanica tijekom sazrijevanja, pospješujući popravak i tako sprječavajući aktivaciju apoptskog odgovora ovisnog o oštećenju DNA tijekom višestrukih krugova preuređivanja DNA prilikom sazrijevanja BCR (Rosado *i sur.*, 2013; Stępnik *i sur.*, 2017). Linija Jurkat imala je nešto veću ekspresiju PARG-a i YY1 nego preostale tri linije.

Utjecaj inhibicije puta Notch na leukemijskim staničnim linijama

Analizirane su promjene u skupini gena/proteina uključenih u signalne putove PARP i Notch nakon dugotrajnog tretmana triju leukemijskih linija specifičnim inhibitorima. Analizirana je linija limfocita T (Jurkat) s aktivnim putem Notch, zatim stanična linija leukemije limfocita pre-B kod koje put Notch nije aktivan (697) te linija kronične limfocitne leukemije dobivena imortalizacijom stanica pomoću EBV (CLL). Linija CLL nije imala aktivnu intracelularnu domenu NOTCH1, a pokazala je ekspresiju nizvodne mete puta Notch, gena *HES1*, neovisno o inhibiciji puta Notch.

Analizirajući promjene u ekspresiji kod stanica tretiranih inhibitorom γ-sekretaze DAPT, primijećena je inhibicija gena za koje se zna da su produkti aktivacije puta Notch u stanicama gdje je Notch put bio aktivan. Inhibicija γ-sekretaze može za posljedicu imati i inhibiciju niza molekula koje su njezini izravni supstrati (oko 90 proteina, ako ih stanica eksprimira). Pored Notch receptora, to su ligandi Delta i Jagged i amiloidni prekursorski protein (LaVoie i Selkoe, 2003). Međutim, čak i ako njihova konformacija dopušta γ-sekretazi da ih cijepa, teško je predvidjeti učinak na ekspresiju gena jer su ciljani geni regulirani kroz višestruke pozitivne i negativne povratne veze kao i strukturom kromatina u mjestu promotora.

Stanice Jurkat predstavljaju tipične stanice s aktivnim Notch signaliziranjem, čija je signalizacija inhibirana γ-sekretazom. Već 24 h nakon inhibicije došlo je do smanjenja ekspresije gena reguliranih Notch-om kao što su *HES1* i *c-MYC*. Također smo primijetili inhibiciju ekspresije gena *JAGGED1*, liganda receptora Notch i mogućeg supstrata γ-sekretaze.

Inhibicija Notch signalizacije nije uzrokovala zaustavljanje stanične proliferacije ili apoptozu, a stanice su ostale vijabilne. Stanice Jurkat pripadaju skupini T-ALL otpornoj na inhibitore Notch puta zbog poremećaja ekspresije tumorskog supresora PTEN. Naime, ekspresija PTEN-a u stanicama divljeg tipa inhibira putove preživljenja aktivirane kinazama PI3K i Akt i zaustavlja proliferaciju. Promotor *PTEN-a* je reguliran s HES1, produktom aktivacije puta Notch. Kod stanica Jurkat i nekih drugih T-ALL ova povratna veza koja ograničava staničnu proliferaciju je dokinuta nedostatkom tumorskog supresora PTEN i ove stanice postaju ovisne o putu preživljenja Akt i neovisne o putu Notch u regulaciji proliferacije (Hales *i sur.*, 2013; Palomero *i sur.*, 2007).

Drugi gen, čija je ekspresija smanjena inhibicijom puta Notch, jest *c-MYC*. Taj se gen također može regulirati s nekoliko putova, kao što su npr. putovi preživljenja. *c-MYC* je kod CLL i stanica Jurkat smanjen za 50 %. Možemo pretpostaviti da je kod linije CLL smanjenje ekspresije *c-MYC*-a povezano sa smanjenjem stanične proliferacije, a kod linije Jurkat stanična proliferacija se pokazala neovisna o ekspresiji *c-MYC*. Posljedica je toga vjerojatno postojanje drugih signalnih putova koji prisiljavaju na proliferaciju. Smanjenje *c-MYC* u proliferirajućim stanicama nije neuobičajeno u biologiji limfocita, tj. slične su značajke prisutne u nekim dijelovima germinativnog centra limfnih čvorova (Klein i Dalla-Favera, 2008). Osim toga, Notch i c-MYC također mogu biti povezani regulacijskim petljama koje uključuju mikroRNA (uglavnom mikroRNA30a) u B- i T-leukemijama (Ortega *i sur.*, 2014). U pre-B leukemijskim stanicama također se ustanovilo da IKZF1 i IKZF3 inhibiraju proliferaciju kroz smanjenje c-MYC ekspresije (Ma *i sur.*, 2010).

JAGGED1 je ligand receptora Notch čija se uloga u regulaciji puta Notch još uvijek istražuje. Pronađeno je da JAGGED1 povećava signalizaciju puta Notch u limfomima, putem okosnice NOTCH2-HEY1 (Cao *i sur.*, 2014). U određenim tkivima utvrđeno je da recipročna regulacija putova djeluje na DLL1 i JAGGED1 tj. povećana ekspresija *JAGGED1* smanjuje ekspresiju *DLL1 i NOTCH1* (Robinson *i sur.*, 2017). Nedavno je otkriveno da se JAGGED1 može cijepati istim molekulama kao i receptor NOTCH te da intracelularna domena može uzrokovati transdukciju signala u stanici domaćina, natječući se s NICD (LaVoie and Selkoe, 2003). Dakle, budući da je supstrat γ-sekretaze, moguće je da DAPT inhibira njegovu ekspresiju u stanicama Jurkat pomoću povratnog signala. Dakle, kako u drugim dvjema linijma gdje nije bilo aktivnog puta Notch, DAPT nije uzrokovao smanjenje ekspresije *JAGGED1*, te bi se moglo zaključiti da je

smanjenje ekspresije *JAGGED1* u staničnoj liniji Jurkat uzrokovano dokidanjem signalizacije putem Notch (Chen *i sur.*, 2010).

Produljeni tretman inhibitorom γ-sekretaze izazvao je promjene u ekspresiji ne samo gena koji su izravno regulirani, već i kod transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros: kod stanica Jurkat i 697 došlo je do smanjenja IKZF3, a kod CLL IKZF1, neovisno o aktivnosti puta Notch. Njihova uloga u regulaciji stanica još je uvijek nedovoljno poznata. IKZF1 je važan za usmjeravanje limfocita prema lozi limfocita T i poremećaj njegove funkcije pronađen je u skupini T-ALL (Sun *i sur.*, 1999). Proteini iz porodice Ikaros djeluju kao transkripcijski faktori i mogu imati ulogu u remodeliranju kromatina kroz interakcije s kompleksom NuRD (Billot *i sur.*, 2011; Oestreich *i* Weinmann, 2011). IKZF1 cilja elemente slične kao i RBPJ, koji su i meta signaliziranja putem NICD. Na ovim specifičnim sljedovima nukleotida često dolazi do suradnje ili kompeticije između različitih transkripcijskih faktora. IKZF1 utječe na repertoar ciljanih gena puta Notch u limfocitima T, djelujući na regulatorne sljedove nukleotida na koje se veže protein RBPJ (Jeannet *i sur.*, 2010; Kathrein *i sur.*, 2008), a Notch signalnom petljom regulira ekspresiju IKZF1 u T-ALL. Ekspresija IKZF1 smanjena je kod T-ALL pacijenata s mutiranim elementima puta Notch. Pretpostavljeni je mehanizam natjecanje za vezanje na ciljne promotore, npr. za gen *MYC* (Witkowski *i sur.*, 2015). IKZF1 i IKZF3 smatraju se tumorskim supresorima, a njihova nemogućnost da obavljaju svoje funkcije povezana je s razvojem tumora. Utišavanje gena *IKZF1* smanjuje diferencijaciju limfocita B u plazma-stanice (Ochiai *i sur.*, 2018). Nedavno je pronađen novi mehanizam kojim Ikaros sudjeluje u transkripcijskom kompleksu s IRF4 i tako regulira gene koji bi trebali utišati ekspresiju tijekom diferencijacije plazma-stanica (Marke *i sur.*, 2018; Ochiai *i sur.*, 2018). Također je otkriveno da IKFZ1 potiskuje ekspresiju gena *PI3K*. Ti podaci upućuju na ulogu ove porodice u signalnim petljama koje reguliraju diferencijaciju krvnih stanica. Možda se inhibicija signalnog puta koja stimulira proliferaciju, treba uravnotežiti inhibicijom tumorskog supresora, kroz svoje signalne krugove, da bi zadržala održivost i proliferaciju. Osim toga, gubitak IKFZ1 dovodi do nedjelotvornosti terapije inhibitorom tirozin kinaza u određenim vrstama leukemija, te bi sposobnost kemoterapije da smanji njegovu ekspresiju mogla imati utjecaja na konačni učinak antikancerogene terapije (Evangelisti *i sur.*, 2018).

Promjene ekspresije transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros postale su značajne nakon produženog razdoblja inhibicije γ-sekretaze, što ukazuje na indirektno i sekundarno signaliziranje. Promotor IKZF1 izuzetno je složen, ima nekoliko različitih modula/pojačivača

koji tvore regulacijske jedinice kako bi se regulirala njegova ekspresija tijekom diferencijacije različitih hematopoetskih stanica. Ove regulatorne regije ovise o brojnim transkripcijskim faktorima, kao što su IKZF1, ETS1, c-MYC, RUNX1 itd., a neki od njih mogu biti uključeni u pozitivne i negativne petlje puta Notch (Yoshida *i sur.*, 2013). IKZF1 također kontrolira ekspresiju *IKZF3* (Ghadiri *i sur.*, 2007).

Kod staničnih linija loze limfocita B, aktivacija puta Notch dovela je do apoptoze pojedinih tipova leukemijskih pre-B stanica (Kannan *i sur.*, 2011). S druge strane, dio podtipova B-CLL može imati konstitutivno aktivan put Notch, uglavnom zbog mutacija domene PEST uključene u degradaciju proteina. Ove stanice su ovisne o putu Notch i ukidanje tog signala može dovesti do apoptoze (Rosati *i sur.*, 2009). Naš model, linija CLL, pokazala je aktivne nizvodne putove Notch, ali nakon inhibicije aktivacije receptora Notch stanice nisu krenule u apoptozu. Dugotrajni tretman doveo je do smanjenja proliferacije za 20 %. Analiza proteina pokazala je odsutnost NICD1, unutarstanične domene receptora NOTCH1, ali ekspresiju nizvodne mete HES1, čak i nakon tretmana inhibitorom DAPT. Zaključeno je da stanice eksprimiraju EBNA2, rani EBV proteini uključen u latenciju tipa II i III, vjerojatno kao posljedicu imortalizacije primarnih stanica. EBNA2 veže se na sljedove nukleotida kao i protein RBPJ u genomu, natječući se s unutarstaničnom domenom aktiviranog receptora Notch (NICD) (Henkel *i sur.*, 1994) te je vjerojatno odgovorna za ekspresiju *HES1* i *c-MYC*. Međutim, razina ekspresije *EBNA2* nije se značajno promijenila nakon tretmana inhibitorom DAPT, tako da su u modulaciju ekspresije nizvodnih gena moguće uključeni složeniji mehanizmi.

U konačnici možemo zaključiti da svaka vrsta leukemije i leukemijske stanične linije ima jedinstvenu mrežu signalnih putova povezanih s povratnim petljama i ne reagiraju na inhibiciju određenog puta na isti način. Stanice Jurkat i CLL, iako imaju eksprimirane nizvodne elemente puta Notch, ne reagiraju na inhibitor puta Notch staničnim zaustavljanjem, diferencijacijom ili apoptozom. U sličnim eksperimentima s različitim tipovima tumora, određeni znakovi diferencijacije uzrokovali su promjene u uzorku metilacije DNA i obrascima vezanja određenih transkripcijskih faktora, ali kada je uklonjen faktor rasta stanice su ponovno ušle u ciklus proliferacije. Perzistentna ekspresija onkogena spriječila je pojavu znakova diferencijacije (Carén *i sur.*, 2016). Iako smo pokazali da dugotrajni tretman može uzrokovati promjene u ekspresiji signalnih molekula, moguće je da su drugi signalni krugovi koji potiču proliferaciju dominirali nad putem Notch, zbog čega su se ove stanice pokazale otporne na apoptozu i diferencijaciju.

Naša istraživanja na modelnim staničnim linijama trebala bi poslužiti kao uvod u istraživanje odgovora primarnih limfocita B i T, kao i primarnih stanica leukemija. Pojedine podskupine limfocita B i T su analizirane u nizu eksperimenata. Tako je pokazano da različiti inhibitori puta Notch utječu na rani razvoj limfocita T, kao i na smanjenje proizvodnje citokina u aktiviranim limfocitima T (Dar *i sur.*, 2017). Kod limfocita B, inhibicija Notch-a nije značajno utjecala na vijabilnost normalnih perifernih limfocita B, ali je prouzročila iscrpljivanje limfocita B u marginalnoj zoni limfnih čvorova *in vivo* (Meng *i sur.*, 2011). Kod primarnih leukemijskih stanica, inhibicija puta Notch pokazala se citotoksična za podskupinu B- i T-leukemija mutiranog i aktivnog receptora Notch (Kogoshi *i sur.*, 2007; Rosati *i sur.*, 2009).

Utjecaj inhibicije proteina PARP na leukemijskim staničnim linijama

Osim analize utjecaja puta Notch, u ovom je radu analiziran i utjecaj inhibicije proteina PARP na leukemijske stanične linije. Iako se osnovnom funkcijom PARP-a smatra njegova uloga u odgovoru na oštećenje DNA, značajna je njegova uloga u oblikovanju kromatina, procesima transkripcije i diferencijacije. PARP1 može modulirati aktivnost nekoliko transkripcijskih faktora, bilo putem interakcija protein-protein ili putem parpilacije, dodavanjem poliADP-riboze. Neki od tih transkripcijskih faktora imaju bitnu ulogu u biologiji hematopoetskih stanica, poput NF-κB, p53 i NFAT. Dio procesa u kojima sudjeluje zahtijeva aktivaciju PARP-a, a dio procesa je posredovan proteinskim interakcijama. Zbog toga inhibitor aktivacije PARP-a (PJ-34) može utjecati samo na skup aktivnosti PARP-a u stanici. Direktna povezanost proteina PARP i puta Notch utvrđena je kod živčanih stanica gdje PARP modificira kompleks u kojem sudjeluje transkripcijski faktor HES1 i tako mijenja njegovu funkciju (Ju *i sur.*, 2004). Kannan i sur. (Kannan *i sur.*, 2011) pokazali su da aktivacija signalizacije puta Notch kod B-ALL dovodi do usporavanja rasta i apoptoze, pri čemu dolazi do modifikacije faktora HES1 pomoću PARP1.
Inhibicija aktivnosti PARP-a nije bitno utjecala na proliferaciju staničnih linija limfocita T i B korištenih kao modeli u našim istraživanjima, niti je značajno interferirala s inhibicijom puta Notch. Iako su stanice 697 i Nalm6 pre-B podrijetla, kod njih nije bio eksprimiran HES1, te se pretpostavlja da inhibicija PARP-a nije mogla tim putem utjecati na preživljavanje i proliferaciju ovih stanica.
Kod sve tri linije najizrazitiji učinak inhibicije enzima PARP bio je utjecaj na ekspresiju liganda *JAGGED1*. Kod stanica limfocita B njegova je ekspresija bila povećana, a kod stanica Jurkat

ekspresija *JAGGED1* bila je smanjena. Jedna od mogućnosti je da PARP1 modulira i aktivacijske i represijske komplekse na promotoru gena, ovisno o unutarstaničnom okruženju (Ju *i sur.*, 2004), a druga da PARP modulira različite transkripcijske faktore koji su prisutni u različitim tipovima stanica, kao što su NFAT1, NF-kB i drugi (Hassa *i* Hottiger, 1999; Krishnakumar *i* Kraus, 2010; Valdor *i sur.*, 2008). Mete PARP1 također su transkripcijski faktori SMAD, koji utječu na trajanje signalizacije putem TGF-β, a JAGGED1 je meta tog puta (Chen *i sur.*, 2001; Lönn *i sur.*, 2010). S druge strane, analiza ekspresije *TGFβ* nakon inhibicije PARP-a otkrila je smanjenje ekspresije kod stanica Jurkat nakon produženog tretmana. U ostalim staničnim linijama ekspresija *TGFβ* nije bila značajno promijenjena nakon djelovanja inhibitora (podaci nisu prikazani).

Kombinacije inhibitora DAPT i PJ-34 nisu dale značajne promjene u odnosu na pojedinačne tretmane kod stanica B- i T-linija s aktivnim putom Notch. U skladu s ovim rezultatima je studija citotoksičnosti antitumorskih lijekova primijenjenih u kombinaciji s inhibitorom PJ-34 na leukemijskim stanicama u kojoj nije zamijećeno značajno povećanje efikasnosti lijeka (Stępnik *i sur.*, 2017).

Naši rezultati pokazali su da učinci inhibicije PARP-a, slično kao i kod putova Notch, iako utječu na slične skupine gena u različitim staničnim linijama, također u velikoj mjeri ovise o intracelularnom okruženju svake stanične linije. Učinci inhibicije PARP-a analizirani su u pokusima koji su testirali olaparib, inhibitor PARP-a koji se koristi za liječenje raka. Inhibicija PARP-a kod imortaliziranih limfocita B nije uzrokovala smanjenje vijabilnosti stanica. Na molekularnoj razini, Martin i sur. otkrili su da olaparib uzrokuje promjene u ekspresiji gena koji su uključeni u reakciju na stres, ubikvitinizaciju proteina i signalizaciju stanica, vjerojatno putem regulacije epigenetskih regulatora EZH2 i NFAT (Martin *i sur.*, 2015). Ti su procesi uključeni u diferencijaciju stanica i ekspresiju citokina. S obzirom na limfoidne tumorske stanice, inhibicija PARP-a pokazala se citotoksičnom za stanice koje nemaju normalnu razinu kinaze ATM, odgovorne za nizvodnu aktivaciju putova nakon dvolančanog loma DNA, *in vivo* i *in vitro* (Weston *i sur.*, 2010). Svi ovi podaci upućuju na nužnost otkrivanja globalnog uvida u mehanizme upravljanja signalizacijskih mreža koje uključuju Notch i PARP u pojedinim vrstama stanica.

Utjecaj inhibitora kazein kinaze II na leukemijske stanične linije

Nakon analize djelovanja direktnih inhibitora putova Notch i PARP, napravljeni su eksperimenti u kojima se pokušalo indirektnim putovima utjecati na njihovu aktivnost odnosno ekspresiju. Jedna od metoda je bila obrada stanica inhibitorom kazein kinaze II za koju je utvrđeno da može utjecati na biološku aktivnost Ikarosa, a preko njega moguće i modificirati aktivnost puta Notch. Druga metoda je obuhvaćala promjenu ekspresije polikomb proteina YY1 koji bi mogao povratnom vezom utjecati na ekspresiju proteina PARP.

Odnedavno se u klinička ispitivanja lijeka za hematološke maligne bolesti uveo spoj CX-4945 (Arcaro *i sur.*, 2015). CX-4945, također poznat kao Silmitasertib, visoko je specifičan, kompetitivni inhibitor za ATP-vezno mjesto kazein kinaze II, CK2. CK2 ima niz meta u stanici: aktivira putove preživljenja PI3K/Akt/mTOR te fosforilira Ikaros, čime utječe na njegovu lokalizaciju i sprječava njegovo djelovanje kao tumorskog supresora u jezgri (Arcaro *i sur.*, 2015; Siddiqui-Jain *i sur.*, 2010). Fosforiacija transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros ima važnu ulogu u njihovoj funkciji i tumorigeničnosti (Antica *i sur.*, 2007; Molnár *i sur.*, 1994). CX-4945 djeluje citotoksičnosto i izaziva apoptozu i trenutno se ispituje u kliničkim ispitivanjima za liječenje mnogih vrsta tumora. Fokus terapijskog potencijala CX-4945 pomaknuo se s čvrstih tumora na hematološke maligne bolesti jer je pokazano da inhibicija CK2 inhibira proliferaciju leukemijskih stanica (Song *i sur.*, 2015). Ovaj spoj nedavno je uveden kao terapija za B-ALL budući da, sprječavajući fosforilaciju Ikarosa, omogućuje mu da djeluje kao tumorski supresor (Arcaro *i sur.*, 2015).

Budući da su prethodna istraživanja pokazala da je meta Ikarosa i kompleksa NICD isti sljed nukleotida u promotoru, te da oni mogu kompetirati, hipoteza je bila da bi se aktivacijom Ikarosa pomoću CX-4945 moguće inhibirao put Notch (Kathrein *i sur.*, 2008).

Stanice tretirane inhibitorom CK2 (CX-4945) kod većih koncentracija očekivano su pokazale smanjenje proliferacije i smanjenje vijabilnosti. Kako bismo mogli ispitati učinak inhibitora na molekularnoj razini, odlučili smo koristiti koncentraciju od 5 μM koja se pokazala kao ona koja smanjuje proliferaciju, ali stanice ostaju vijabilne. Pokazalo se da smanjena vijabilnost korelira sa smanjenom ekspresijom *c-MYC* kod staničnih linija Jurkat i CLL. Nakon devetodnevnog tretmana inhibitorom CX-4945 ekspresija gena *HES1* bila je smanjena. Ovo je vjerojatno posljedica aktivacije IKFZ1 zbog inhibicije CK2, a koji zatim može direktno suprimirati ekspresiju *HES1* (Chari i Winandy, 2008; Kathrein *i sur.*, 2008; Song *i sur.*, 2015). Zanimljivo je

da je i kod stanične linije CLL postignut isti učinak, iako smo pokazali da je ekspresija gena *HES1* posljedica prisutnosti proteina EBNA2. Očekivano, ovaj učinak nije zamijećen kod linije 697 koja nema aktivnu signalizaciju putem Notch.

Kod stanične linije Jurkat, nakon dugotrajnog tretmana inhibitorom CX-4945, značajno je bila smanjena i ekspresija *JAGGED1*, slično kao i kod tretmana inhibitorom DAPT, vjerojatno posljedica dokidanja signalizacije putem Notch koji pozitivno regulira njegovu ekspresiju (Chen *i sur.*, 2010).

Utjecaj ekspresije proteina YY1 na ekspresiju PARP1

Ekspresija proteina PARP1 pokušala se modulirati povećanjem ekspresije proteina YY1. Naime, pokušaj povećanja ekspresije proteina PARP1 direktnim unosom plazmida koji ga kodira nije bio uspješan. Dok su stanice limfocita pre-B otporne na transfekciju uobičajenim metodama, stanice Jurkat su uspješno transficirane, međutim citomegalovirusni promotor se utišao u klonovima. Prijašnji eksperimenti na glioblastomskim stanicama su pokazali slične rezultate (podaci nisu objavljeni). Utišavanje gena PARP pomoću shPARP1 bilo je letalno za stanice Jurkat (podaci nisu objavljeni). Budući da se transkripcijski faktor YY1 i PARP1 međusobno recipročno reguliraju, pokušalo se modulacijom YY1 utjecati na ekspresiju PARP1. Transkripcijski faktor Yin Yang 1 (YY1) je protein polikomb koji ima temeljnu ulogu u biološkim procesima kao što su embriogeneza, diferencijacija, replikacija i stanična proliferacija (Gordon *i sur.*, 2006). Parpilacija YY1 utječe na njegovu sposobnost regulacije izolacije dijelova kromatina (funkcija insulatora) kao i u stvaranju trodimenzionalne strukture kromatina. Analiza utjecaja povećane ekspresije proteina YY1 na signalne putove Notch i PARP, ukazala je na njihovu međusobnu povezanost. Naime, pokazano je da interakcija YY1 s PARP1 stimulira aktivnost enzima PARP1, što rezultira poboljšanim popravkom DNA, kao i da YY1 regulira promotorsku

u gena za *PARP1* (Vidaković *i sur.*, 2009). Također, povećana ekspresija PARP1 smanjuje afinitet YY1 prema mjestima vezanja za kromatin putem poli-ADP-ribozilacije i izaziva utišavanje transkripcije (Oei *i* Shi, 2001a, 2001b).

Naši eksperimenti su pokazali da stanice Jurkat s povećanom ekspresijom YY1 nisu imale promijenjenu ekspresiju *PARP1* niti *PARG*. Međutim, kako YY1 regulira velik broj promotora, detektirali smo povećanu ekspresiju elementa puta Notch kao i njegovih nizvodnih meta.

Također, povećanje ekspresije YY1 uzrokovalo je i do devet puta veću ekspresiju *IKFZ3*. Jedna je od mogućnosti da YY1 potiče ekspresiju receptora Notch, direktno ili nekim indirektnim putem, a kako je kod stanica Jurkat receptor Notch mutiran i zbog toga aktivan, povećanje njegove ekspresije dovodi do povećanja ekspresije njegovih nizvodnih meta (Liao *i sur.*, 2007). Ovo istraživanje trebalo bi nastaviti i ispitati je li povećanje ekspresije *IKFZ3* posljedica povećane prisutnosti YY1 ili povećane aktivnosti puta Notch.

Sustavi aktivacije puta Notch

Da bismo mogli analizirati utjecaj aktivacije puta Notch, pokušali smo ga aktivirati kod linija pre-limfocita B. Stanice pre-B ALL-a pokazale su se refraktorne na pokušaje transfekcije plazmidom koji nosi sljed nukleotida koji kodiraju za intracelularnu domenu proteina Notch, NICD1, a omogućio bi konstitutivnu aktivaciju puta. Strategija aktivacije puta Notch ligandom DLL1 otopljenim u mediju također nije dovela do aktivacije receptora Notch, koji je eksprimiran, ali neaktivan kod ove linije. Kod nekih drugih tipova stanica poput makrofaga, embrionalnih stanica i stanica akutne mijeloidne leukemije (AML), ovom se metodom uspjelo aktivirati put Notch i to je dovelo do različitih staničnih odgovora (Lee *i sur.*, 2013; Tohda *i sur.*, 2005; Tsao *i sur.*, 2011). Kod nekih je došlo do diferencijacije i promjena u proliferaciji, a neke nisu pokazale nikakav stanični odgovor. Neki znanstvenici tvrde da otopljeni ligand DLL1 djeluje kao antagonist puta Notch (Hallahan *i sur.*, 2004; Klose *i sur.*, 2015; Trifonova *i sur.*, 2004), dok neki objašnjavaju da je potrebno fiksirati ligand kako bi mogao aktivirati receptor Notch, vjerojatno zbog mehaničke protusile koja nakon vezanja receptora mora osloboditi regiju receptora da bi se mogla cijepati (Morrison *i sur.*, 2000; Varnum-Finney *i sur.*, 2000). Najčešće se u tu svrhu koristi vezanje za podlogu liganda fuzioniranog s domenom Fc ili se ligand fiksira pomoću matrigela. Naš model je uključivao fiksaciju liganda pomoću želatine. Međutim ni ova metoda nije dovela do pojave ekspresije nizvodnog gena *HES1* iako postoje naznake blagog povećanja ekspresije gena *DELTEX1*. *DELTEX1* se također nalazi nizvodno od puta Notch, a ima ulogu u negativnoj regulaciji puta Notch (Matsuno *i sur.*, 1998; Zhang *i sur.*, 2010).

Također, eksperimenti s kokulturom stanica 697 s linijama koje eksprimiraju ligande DSL, Jurkat i linijom humanog glioblastoma A1235 (podaci nisu prikazani) nije došlo do smanjenja vijabilnosti kao ni proliferacije stanica 697.

Kao najoptimalnija metoda aktivacije receptora Notch danas se koristi kokultura hematopoetskih stanica s mišjim stromalnim stanicama OP9. Ove stanice su transficirane sljedom nukleotida koji kodiraju za ligand *DLL1* i pokazale su se uspješne u usmjeravanju limfoidnih progenotorskih stanica prema lozi limfocita T (Matulic *i sur.*, 2015; Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002; Taghon *i sur.*, 2005). Kod kokulture stanica 697 sa stanicama koje izražavaju ligande DSL, nije zamijećeno zaustavljanje rasta, dok je u kokulturi na stanicama OP9-DL1 došlo do povećanja smrtnosti za 56,5 % nakon 7 dana kokultivacije. Međutim, analizom ekspresije nizvodnih meta puta Notch stanica 697 nije pokazana aktivacija. Moguće objašnjenje nemogućnosti aktivacije puta Notch, u linijama limfocita pre-B, jest da u stanicama loze limfocita B prirodno nije prisutna Notch signalizacija (osim u specifičnim fazama razvoja) te da njihov unutarstanični milje, prisutnost transkripcijskih faktora i struktura kromatina onemogućava aktivaciju nizvodnih gena. Moguće je da i epigenetička regulacija ima ulogu u utišavanju gena povezanih s putem Notch. Kuang i suradnici su pokazali da kod pacijenata s B-ALL postoji hipermetilacija elemenata puta Notch za razliku od pacijenata s T-ALL (Kuang *i sur.*, 2013). U tome ide u prilog i činjenica da mutacije NOTCH1 nisu povezane s razvojem B-ALL, a signalizacija puta Notch pokazala se kao induktor zaustavljanja rasta i apoptoze kod određenih tipova malignih limfocita B (Zweidler-McKay *i sur.*, 2005). Međutim kod nekih leukemija loze limfocita B signalizacija putem Notch se pokazala kao ona koja spašava od apoptoze (Liu *i sur.*, 2013; Nwabo Kamdje *i sur.*, 2011).

NICD1 ima 13986 veznih mjesta u genomu čovjeka od kojih je samo 10 % aktivno kod T-ALL, što zbog ustrojstva kromatina, što zbog prisutnih regulatora transkripcije (Wang *i sur.*, 2014). Istražili smo može li inhibicija aktivnosti PARP-a djelovati na kromatin i doprinijeti drugačijem staničnom odgovoru (Krishnakumar *i* Kraus, 2010). Kod kokulture stanica 697 na OP9-DL1 tretiranih inhibitorom aktivnosti PARP-a, na razini ekspresije stanica 697 došlo je do značajnog povećanja ekspresije liganda *JAGGED1* i smanjenja ekspresije gena *DELTEX1*. Slični su rezultati dobiveni kod eksperimenata u kojima je praćen utjecaj inhibitora na staničnu ekspresiju kod monokultura stanica 697. Zanimljivo je da same stanice 697 eksprimiraju ligand JAGGED1, te ako bi ovaj ligand aktivirao put Notch i potaknuo apoptozu, ne bi bio moguć njen opstanak. S druge strane, istraživanja su pokazala da kod stanica koje eksprimiraju i receptor i ligand dolazi do cis-interakcija s ligandom koje djeluju inhibitorno na receptor Notch i onemogućava njegovu aktivaciju (del Álamo *i sur.*, 2011; Palmer *i sur.*, 2014).

Moguće objašnjenje razlika u biologiji stanica 697 kod uzgoja u kokulturi sa stanicama Jurkat i A1235 i u kokulturi s OP9-DL1, jest da mikrookoliš koji pružaju stromalne stanice OP9 omogućava aktivaciju puta Notch kod frakcije stanica koje odlaze u apoptozu (Burger *i sur.*, 2009; Scott *i* Gascoyne, 2014). Međutim, ekspresija nizvodnih meta puta analizirana je u sortiranoj frakciji živih stanica i ove su stanice pokazale male promjene u ekspresiji negativnih regulatora puta Notch (*NUMB, RUNX1*, a u prisustvu inhibitora PJ-34 smanjen je i *DELTEX1*). OP9 stanice koje ne eksprimiraju ligand DLL1 podržavaju inače razvoj limfoidnih progenitora prema B-lozi (Taghon *i sur.*, 2005; Zhang *i sur.*, 2016) jer kao stromalne stanice izolirane iz koštane srži luče niz molekula (poput Flt3-L, IL-7) koje su bitne za normalnu diferencijaciju hematopoetskih stanica.

Moglo bi se zaključiti da stanice 697 imaju mehanizme koji sprječavaju aktivaciju puta Notch i/ili ekspresiju njegovih nizvodnih meta jednostavnim kontaktom liganda i receptora. Moguće je da sustav aktivacije ovih stanica traži dodatne membranske receptore ili kofaktore, budući da limfociti B u organizmu programirano aktiviraju ovaj put samo u određenim fazama razvoja i u specifičnom mikrookolišu, iako mnoge stanice s kojima dolaze u dodir imaju eksprimiran neki od liganada (Bertrand *i sur.*, 2000).

Uloga modulacije putova Notch kod leukemija

Razvoj hematopoetskih stanica je vrlo kompleksan i normalne stanice ovise o pravovremenom uključivanju puta Notch i njegovom isključivanju, o varijantama receptora i liganda, o mikrookolišu i unutarstaničnom miljeu. Poremećaji u aktivaciji puta Notch imaju drugačije uloge u različitim tumorima hematopoetskih stanica, akutnim ili kroničnim, vjerojatno ovisno o stupnju diferencijacije limfocita, na kojem se odvija glavni leukemogeni događaj (Talora *i sur.*, 2008).

Neke leukemije su "ovisne o Notch signalizaciji" (Medyouf *i sur.*, 2010) i njegovo dokidanje dovodi do ugibanja stanica (npr T-ALL), dok kod nekih stanica aktivacija nekog drugog puta koji dominantno potiče proliferaciju čini stanice neovisnim o Notch-u (Hales *i sur.*, 2013; Palomero *i sur.*, 2007). I dio podtipova B-CLL može imati konstitutivno aktivan put Notch, uglavnom zbog mutacija domene PEST uključene u degradaciju proteina i ukidanje tog signala može dovesti do apoptoze (Rosati *i sur.*, 2009). Nasuprot tome, kod nekih leukemija limfocita B aktivacija puta Notch dovodi do apoptoze (Zweidler-McKay *i sur.*, 2005).

Zbog važne uloge puta Notch u diferencijaciji mnogih stanica u različitim tkivima, otežano je terapeutski utjecati na put Notch kod hematoloških oboljenja. Terapija leukemija sprječavanjem signalizacije putem Notch u pacijenata s T-ALL inhibicijom γ-sekretaze došla je već do pretkliničkih i kliničkih istraživanja (Ran *i sur.*, 2017). Uz inhibitore γ-sekretaze postoje i druge strategije utišavanja puta Notch, poput inhibirajućih antitijela ili liganda (Hernandez Tejada *i sur.*, 2014). Nasuprot tome, agonisti puta Notch još nisu ušli u klinička ispitivanja, iako aktivacija signalizacije putem Notch, koja inhibira rast i preživljavanje kod nekih AML i B-ALL, ima veliki potencijal za kliničku upotrebu (Kumar *i sur.*, 2016).

Kako bi terapija bila ciljana i uspješna bitno je dobro poznavati genezu i biologiju malignih oboljenja. Iz ovog rada vidljivo je da su leukemije limfocita vrlo raznolike zbog kompleksnih procesa i stupnjevite diferencijacije ovih stanica, te da ponekad ciljanje samo jedne mete nije dovoljno za inhibiciju proliferacije. Da bi se mogla primijeniti ciljana, personalizirana terapija za svaki tip leukemije potreban je razvoj dobrih dijagnostičkih alata i daljnja istraživanja složenih mehanizama regulacije signalnih putova.

6. ZAKLJUČCI

Stanična linija Jurkat (akutna leukemija limfocita T) ima aktivan put Notch, dok stanična linija CLL (kronična leukemija limfocita B) ima prisutne nizvodne elemente puta Notch, zbog prisutnosti virusnog proteina EBNA2. Stanične linije 697 i Nalm6 (akutne limfoblastične leukemije prekursora limfocita B) nemaju aktivnu signalizaciju putem Notch iako eksprimiraju receptore.

Dugotrajna inhibicija signalizacije putevima Notch i PARP kod linija Jurkat, CLL i 697 nije uzrokovala zaustavljanje proliferacije ili apoptozu, ali su inducirane promjene u ekspresiji određenih skupina gena. Inhibicija PARP-a uzrokovala je promjene u ekspresiji *JAGGED1* u sva tri tipa staničnih linija. Kod linije Jurkat ekspresija *JAGGED1* bila je smanjena, dok je kod linije CLL i 697 povećana više od dva puta. Inhibitor γ-sekretaze utjecao je na ekspresiju transkripcijskih faktora iz porodice Ikaros (*IKFZ1* i *IKFZ3*), bez obzira na signalnu aktivnost puta Notch, ali ovisno o tipu limfocita. Kod linije CLL smanjena je ekspresija *IKZF1*, a kod linija Jurkat i 697 smanjena je bila ekspresija *IKZF3*.

Put Notch kod stanica 697 pokušao se aktivirati različitim metodama – dodavanjem liganda DLL1 u medij i uzgojem u kokulturi sa stanicama koje ga eksprimiraju, međutim nije detektirano bitno povećanje ekspresije nizvodnih meta puta.

Uspostavljena je metoda direktne i brze analize ekspresije RNA u malom broju stanica. Uspostavljena metoda primjenjiva je za učinkovitu klasifikaciju stanica i određivanje malignih promjena koje bi mogle poslužiti kao potencijalni markeri u dijagnostici leukemija.

Ovo istraživanje je potvrdilo hipotezu da enzim PARP1 može modulirati put Notch kod pojedinih tipova limfocitnih stanica, međutim svaka vrsta leukemije i leukemijske stanične linije ima jedinstvenu mrežu signalnih putova povezanih s povratnim petljama, te ne reagiraju na inhibiciju/aktivaciju određenog puta na isti način.

POPIS LITERATURE

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (Saunders/Elsevier: 2012). *Cellular and molecular immunology*.

Álamo D, Rouault H, Schweisguth F (2011). Mechanism and Significance of cis-Inhibition in Notch Signalling. *Curr Biol* **21**: R40–R47.

Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Herak Bosnar M, Hranilović D *i sur.* (Institut Ruđer Bošković: Zagreb, 2007). *Metode u molekularnoj biologiji*.

Amé J-C, Spenlehauer C, Murcia G (2004). The PARP superfamily. *BioEssays* **26**: 882–893.

Andersson ER, Lendahl U (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling — are we there yet? *Nat Rev Drug Discov* **13**: 357–378.

Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development* **138**: 3593–3612.

Andreis I, Marušić M, Čulo F, Taradi M, Btinić D, Grčević D *i sur.* (Medicinska naklada: 2010). *Imunologija*.

Antica M, Dubravcic K, Weber I, Raic L, Labar B, Batinic D (2007). A search for a mutation of the Aiolos phosphorylation domain in lymphocytes from patients with leukemia. *Haematologica* **92**: 260–1.

Antica M, Wu L, Shortman K, Scollay R (1994). Thymic stem cells in mouse bone marrow. *Blood* **84**: 111–7.

Arcaro A, Wani R, Kallunki T, Kim J, Chon HJ, Bae KJ *i sur.* (2015). The casein kinase 2 inhibitor, CX-4945, as an anti-cancer drug in treatment of human hematological malignancies. *Front Pharmacol* **6**: 70.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ, Leow CC, Greenwald I, Kimble J *i sur.* (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770–6.

Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, Balestri A, Biondi A, Cazzaniga G *i sur.* (2002). Combined expression of pTα and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3788–3793.

Bertrand FE, Eckfeldt CE, Fink JR, Lysholm AS, Pribyl JA, Shah N *i sur.* (2000). Microenvironmental influences on human B-cell development. *Immunol Rev* **175**: 175–86.

Billot K, Mie Soeur J, Chereau F, Arrouss I, Ne Merle-Bé H, Huang M-E *i sur.* (2011). Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with

epigenetic modifications. *Blood* **117**: 1917–1927.

Boudil A, Skhiri L, Candeias S, Pasqualetto V, Legrand A, Bedora-Faure M *i sur.* (2013). Single-Cell Analysis of Thymocyte Differentiation: Identification of Transcription Factor Interactions and a Major Stochastic Component in Î±Î²-Lineage Commitment. *PLoS One* **8**: e73098.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S *i sur.* (1999). Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* **274**: 22932–40.

Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig W-D, Tolle G *i sur.* (2006). Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* **108**: 1151–7.

Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F (2009). The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* **114**: 3367–75.

Burrows PD, Kubagawa H, Nishimoto N, Kerr WG, Borzillo G V, Hendershot LM *i sur.* (1991). Differences in human B cell differentiation. *Adv Exp Med Biol* **292**: 215–26.

Cao Z, Ding B-S, Guo P, Lee SB, Butler JM, Casey SC *i sur.* (2014). Angiocrine Factors Deployed by Tumor Vascular Niche Induce B Cell Lymphoma Invasiveness and Chemoresistance. *Cancer Cell* **25**: 350–365.

Carén H, Beck S, Pollard SM (2016). Differentiation therapy for glioblastoma – too many obstacles? *Mol Cell Oncol* **3**: e1124174.

Chari S, Winandy S (2008). Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *J Immunol* **181**: 6265–74.

Chen C-R, Kang Y, Massague J (2001). Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor growth arrest program. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 992–999.

Chen FX, Smith ER, Shilatifard A (2018). Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**: 464–478.

Chen X, Stoeck A, Lee SJ, Shih I-M, Wang MM, Wang T-L (2010). Jagged1 expression regulated by Notch3 and Wnt/β-catenin signaling pathways in ovarian cancer. *Oncotarget* **1**: 210–8.

Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R *i sur.* (2007). DNA-

Independent PARP-1 Activation by Phosphorylated ERK2 Increases Elk1 Activity: A Link to Histone Acetylation. *Mol Cell* **25**: 297–308.

Colt JS, Davis S, Severson RK, Lynch CF, Cozen W, Camann D *i sur.* (2006). Residential Insecticide Use and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 251–257.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* **342 (Pt 2)**: 249–68.

D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G (2010). Canonical and Non-Canonical Notch Ligands. *Curr Top Dev Biol* **92**: 73–129.

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, Rubia GD *i sur.* (1999). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie* **81**: 69–75.

Dar AA, Bhat SA, Gogoi D, Gokhale A, Chiplunkar SV (2017). Inhibition of Notch signalling has ability to alter the proximal and distal TCR signalling events in human CD3 + αβ T-cells. *Mol Immunol* **92**: 116–124.

Despars G, Tan J, Periasamy P, O'Neill HC (2007). The role of stroma in hematopoiesis and dendritic cell development. *Curr Stem Cell Res Ther* **2**: 23–9.

Doetsch M, Gluch A, Poznanović G, Bode J, Vidaković M (2012). YY1-Binding Sites Provide Central Switch Functions in the PARP-1 Gene Expression Network. *PLoS One* **7**: e44125.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD *i sur.* (1991). TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**: 649–61.

Evangelisti C, Cappellini A, Oliveira M, Fragoso R, Barata JT, Bertaina A *i sur.* (2018). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition potentiates glucocorticoid response in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol* **233**: 1796–1811.

Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabanian H, Ma J *i sur.* (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of *NOTCH1* mutational activation. *J Exp Med* **208**: 1389–1401.

Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol* **171**: 2000–2016.

Gabrilove JL, Jakubowski A (1990). Hematopoietic growth factors: biology and clinical application. *J Natl Cancer Inst Monogr* 73–7at

Garcia Soriano F, Virág L, Jagtap P, Szabó É, Mabley JG, Liaudet L *i sur.* (2001). Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* **7**: 108–113.

Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN *i sur.* (2005). Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* **437**: 270–274.

Geffers I, Serth K, Chapman G, Jaekel R, Schuster-Gossler K, Cordes R *i sur.* (2007). Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo. *J Cell Biol* **178**: 465–76.

Ghadiri A, Duhamel M, Fleischer A, Reimann A, Dessauge F, Rebollo A (2007). Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression. *FEBS Lett* **581**: 1605–1616.

Gianfelici V (2012). Activation of the NOTCH1 pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **97**: 328–330.

Giebel B, Wodarz A (2012). Notch Signaling: Numb Makes the Difference. *Curr Biol* **22**: R133–R135.

Giovine FS di, Duff GW (1990). Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol Today* **11**: 13–20.

Glittenberg M, Pitsouli C, Garvey C, Delidakis C, Bray S (2006). Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis. *EMBO J* **25**: 4697–706.

Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006). Transcription factor YY1: structure, function and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* **25**: 1125–1142.

Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC (2008). The molecular logic of Notch signaling - a structural and biochemical perspective. *J Cell Sci* **121**: 3109–3119.

Green MR, Gentles AJ, Nair R V., Irish JM, Kihira S, Liu CL *i sur.* (2013). Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* **121**: 1604–1611.

Gunnell A, Webb HM, Wood CD, McClellan MJ, Wichaidit B, Kempkes B *i sur.* (2016). RUNX super-enhancer control through the Notch pathway by Epstein-Barr virus transcription factors regulates B cell growth. *Nucleic Acids Res* **44**: 4636–50.

Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S (2012). The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* **13**: 654–666.

Hakmé A, Wong H-K, Dantzer F, Schreiber V (2008). The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series.

EMBO Rep **9**: 1094–1100.

Hales EC, Orr SM, Larson Gedman A, Taub JW, Matherly LH (2013). Notch1 receptor regulates AKT protein activation loop (Thr308) dephosphorylation through modulation of the PP2A phosphatase in phosphatase and tensin homolog (PTEN)-null T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Biol Chem* **288**: 22836–48.

Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA *i sur.* (2004). The SmoA1 Mouse Model Reveals That Notch Signaling Is Critical for the Growth and Survival of Sonic Hedgehog-Induced Medulloblastomas. *Cancer Res* **64**: 7794–7800.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML *i sur.* (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**: 1361–92.

Hartge P, Colt JS, Severson RK, Cerhan JR, Cozen W, Camann D *i sur.* (2005). Residential Herbicide Use and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**: 934–937.

Hassa PO, Hottiger MO (1999). A Role of Poly (ADP-Ribose) Polymerase in NF-κB Transcriptional Activation. *Biol Chem* **380**: 953–9.

Hassa PO, Hottiger MO (2002). The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1534–53.

Hassa PO, Hottiger MO (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci* **13**: 3046–82.

Henkel T, Ling PD, Hayward SD, Peterson MG (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**: 92–5.

Hernandez Tejada FN, Galvez Silva JR, Zweidler-McKay P (2014). The challenge of targeting notch in hematologic malignancies. *Front Pediatr* **2**: 54.

Hertlein E, Beckwith KA, Lozanski G, Chen TL, Towns WH, Johnson AJ *i sur.* (2013). Characterization of a New Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Line for Mechanistic In Vitro and In Vivo Studies Relevant to Disease. *PLoS One* **8**: 1–12.

Horvat L, Antica M, Matulić M (2018a). Effect of Notch and PARP Pathways' Inhibition in Leukemic Cells. *Cells* **7**: 58.

Horvat L, Skelin J, Puškarić BJ, Feliciello I, Heckel D, Madunić J, *i sur.* (2018b). Notch pathway connections in primary leukaemia samples of limited size. *Transl Med Commun* **3**: 8.

Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* **35**: 208–219.

Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, Hirano K, Yahata T, Ando K *i sur.* (2008). Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* **205**: 2507–2513.

Hubmann R, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, Duechler M, Dettke M *i sur.* (2002). Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**: 3742–7.

Itoh M, Kim C-H, Palardy G, Oda T, Jiang Y-J, Maust D *i sur.* (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell* **4**: 67–82.

Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E, Gameiro P, Clode N, Haury M *i sur.* (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* **194**: 991–1002.

Janeway C (Garland Science: 2005). *Immunobiology : the immune system in health and disease*.

Jeannet R, Mastio J, Macias-Garcia A, Oravecz A, Ashworth T, Geimer Le Lay A-S *i sur.* (2010). Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood* **116**: .

Jeffries S, Robbins DJ, Capobianco AJ (2002). Characterization of a high-molecular-weight Notch complex in the nucleus of Notch(ic)-transformed RKE cells and in a human T-cell leukemia cell line. *Mol Cell Biol* **22**: 3927–41.

Jenkins CR, Wang H, Shevchuk OO, Lam SH, Giambra V, Wang L *i sur.* (2012). Collaboration Between RUNX and NOTCH Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **120**: .

Joseph Sambrook DR (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1, 2 and 3.* .

Ju B-G, Lunyak V V, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK *i sur.* (2006). A Topoisomerase II -Mediated dsDNA Break Required for Regulated Transcription. *Science (80-)* **312**: 1798–1802.

Ju B-G, Solum D, Song EJ, Lee K-J, Rose DW, Glass CK *i sur.* (2004). Activating the PARP-1 Sensor Component of the Groucho/ TLE1 Corepressor Complex Mediates a CaMKinase IIδ-

Dependent Neurogenic Gene Activation Pathway. *Cell* **119**: 815–829.

Jundt F, Schwarzer R, Dörken B (2008). Notch signaling in leukemias and lymphomas. *Curr Mol Med* **8**: 51–9.

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

Kastner P, Chan S (2011). Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *World J Biol Chem* **2**: 108–14.

Kathrein KL, Chari S, Winandy S (2008). Ikaros directly represses the notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *J Biol Chem* **283**: 10476–84.

Katoh M, Katoh M (2006). NUMB is a break of WNT-Notch signaling cycle. *Int J Mol Med* **18**: 517–21.

Kawano Y, Moschetta M, Manier S, Glavey S, Görgün GT, Roccaro AM *i sur.* (2015). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev* **263**: 160–172.

Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL (2004). NAD^+ Dependent Modulation of Chromatin Structure and Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1. *Cell* **119**: 803–814.

Kim MY, Zhang T, Kraus WL (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: `PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal. *Genes Dev* **19**: 1951–1967.

Klein U, Dalla-Favera R (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* **8**: 22–33.

Klose R, Berger C, Moll I, Adam MG, Schwarz F, Mohr K *i sur.* (2015). Soluble Notch ligand and receptor peptides act antagonistically during angiogenesis. *Cardiovasc Res* **107**: 153–163.

Kobbe C von, Harrigan JA, May A, Opresko PL, Dawut L, Cheng W-H *i sur.* (2003). Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage. *Mol Cell Biol* **23**: 8601–13.

Kogoshi H, Sato T, Koyama T, Nara N, Tohda S (2007). Gamma-secretase inhibitors suppress the growth of leukemia and lymphoma cells. *Oncol Rep* **18**: 77–80.

Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**: 661–72.

Koyanagi A, Sekine C, Yagita H (2012). Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **418**: 799-805.

Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* **18**: 2469–73.

Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, Kraus WL (2008). Reciprocal Binding of PARP-1 and Histone H1 at Promoters Specifies Transcriptional Outcomes. *Science (80-)* **319**: 819–821.

Krishnakumar R, Kraus WL (2010). The PARP Side of the Nucleus: Molecular Actions, Physiological Outcomes, and Clinical Targets. *Mol Cell* **39**: 8–24.

Kuang S-Q, Fang Z, Zweidler-McKay P a, Yang H, Wei Y, Gonzalez-Cervantes E *i sur.* (2013). Epigenetic inactivation of Notch-Hes pathway in human B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* **8**: e61807.

Kumar R, Juillerat-Jeanneret L, Golshayan D (2016). Notch Antagonists: Potential Modulators of Cancer and Inflammatory Diseases. *J Med Chem* **59**: 7719–7737.

Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang L-T *i sur.* (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol* **170**: 983–992.

Laemmli UK (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

LaVoie MJ, Selkoe DJ (2003). The Notch Ligands, Jagged and Delta, Are Sequentially Processed by α-Secretase and Presenilin/γ-Secretase and Release Signaling Fragments. *J Biol Chem* **278**: 34427–34437.

Lee JB, Werbowetski-Ogilvie TE, Lee J-H, McIntyre BAS, Schnerch A, Hong S-H *i sur.* (2013). Notch-HES1 signaling axis controls hemato-endothelial fate decisions of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Blood* **122**: 1162-1173.

Liao W-R, Hsieh R-H, Hsu K-W, Wu M-Z, Tseng M-J, Mai R-T *i sur.* (2007). The CBF1-independent Notch1 signal pathway activates human c-myc expression partially via transcription factor YY1. *Carcinogenesis* **28**: 1867–1876.

Liu N, Zhang J, Ji C (2013). The emerging roles of Notch signaling in leukemia and stem cells. *Biomark Res* **1**: 23.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods* **25**: 402–408.

Lönn P, Heide LP van der, Dahl M, Hellman U, Heldin C-H, Moustakas A (2010). PARP-1 Attenuates Smad-Mediated Transcription. *Mol Cell* **40**: 521–532.

Ma S, Pathak S, Mandal M, Trinh L, Clark MR, Lu R (2010). Ikaros and Aiolos Inhibit Pre-B-Cell Proliferation by Directly Suppressing c-Myc Expression. *Mol Cell Biol* **30**: 4149–4158.

Ma SK, Wan TS, Chan LC (1999). Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematol Oncol* **17**: 91–105.

Macon WR, Levy NB, Kurtin PJ, Salhany KE, Elkhalifa MY, Casey TT *i sur.* (2001). Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphomas: a report of 14 cases and comparison with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* **25**: 285–96.

Madunić J, Antica M, Cvjetko P, Požgaj L, Matulić M (2016). Modulation of urokinase plasminogen activator system by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition. *Cytotechnology* **68**: 783–794.

Marke R, Leeuwen FN van, Scheijen B (2018). The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **103**: 565-574.

Martin KA, Cesaroni M, Denny MF, Lupey LN, Tempera I (2015). Global Transcriptome Analysis Reveals That Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Regulates Gene Expression through EZH2. *Mol Cell Biol* **35**: 3934–3944.

Martin N, Schwamborn K, Schreiber V, Werner A, Guillier C, Zhang X-D *i sur.* (2009). PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *EMBO J* **28**: 3534–48.

Matsuno K, Eastman D, Mitsiades T, Quinn AM, Carcanciu ML, Ordentlich P *i sur.* (1998). Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. *Nat Genet* **9**: 74-78.

Matulic M, Skelin J, Radic-Kristo D, Kardum-Skelin I, Grcevic D, Antica M (2015). Notch affects the prodifferentiating effect of retinoic acid and PMA on leukemic cells. *Cytom Part A* **87**: 129–136.

McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA *i sur.* (2006). NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogeneous Disorder of the Notch Signaling Pathway. *Am J Hum Genet* **79**: 169–173.

Medyouf H, Gao X, Armstrong F, Gusscott S, Liu Q, Gedman AL *i sur.* (2010). Acute T-cell leukemias remain dependent on Notch signaling despite PTEN and INK4A/ARF loss. *Blood*

115: 1175–84.

Meng X, Matlawska-Wasowska K, Girodon F, Mazel T, Willman CL, Atlas S *i sur.* (2011). GSI-I (Z-LLNle-CHO) inhibits γ-secretase and the proteosome to trigger cell death in precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **25**: 1135–46.

Miller JFAP (1961). Immunological functtion of the thimus. *Lancet* **278**: 748–749.

Mirandola L, Comi P, Cobos E, Martin Kast W, Chiriva-Internati M, Chiaramonte R (2011). Notch-ing from T-cell to B-cell lymphoid malignancies. *Cancer Lett* **308**: 1–13.

Miwa M, Kanai M, Uchida M, Uchida K, Hanai S (2006). Poglavlje: Roles of Poly(ADP-Ribose) Metabolism in the Regulation of Centrosome Duplication and in the Maintenance of Neuronal Integrity. *Poly(ADP-Ribosyl)ation* Molecular Biology Intelligence Unit. Springer, Boston, MA

Molnár A, Georgopoulos K, Georgopoulos K (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **14**: 8292–303.

Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M *i sur.* (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **24**: 15–28.

Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G *i sur.* (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**: 499–510.

Myoken Y, Kan M, Sato GH, McKeehan WL, Sato JD (1990). Bifunctional effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF-beta binding sites. *Exp Cell Res* **191**: 299–304.

Nwabo Kamdje AH, Mosna F, Bifari F, Lisi V, Bassi G, Malpeli G *i sur.* (2011). Notch-3 and Notch-4 signaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood* **118**: 380–389.

Ochiai K, Kondo H, Okamura Y, Shima H, Kurokochi Y, Kimura K *i sur.* (2018). Zinc finger–IRF composite elements bound by Ikaros/IRF4 complexes function as gene repression in plasma cell. *Blood Adv* **2**: 883–894.

Oei SL, Shi Y (2001a). Poly(ADP-Ribosyl)ation of Transcription Factor Yin Yang 1 under Conditions of DNA Damage. *Biochem Biophys Res Commun* **285**: 27–31.

Oei SL, Shi Y (2001b). Transcription Factor Yin Yang 1 Stimulates Poly(ADP-Ribosyl)ation and

DNA Repair. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 450–454.

Oestreich KJ, Weinmann AS (2011). Ikaros changes the face of NuRD remodeling. *Nat Immunol* **13**: 16–8.

Ortega M, Bhatnagar H, Lin P, Wang L, Aster JC, Sill H *i sur.* (2014). A microRNA-mediated regulatory loop modulates NOTCH and MYC oncogenic signals in B- and T-cell malignancies. *Leukemia* 1–9doi:10.1038/leu.2014.302.

Osborne B, Minter LM (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* **7**: 64–75.

Paddock MN, Buelow BD, Takeda S, Scharenberg AM (2010). The BRCT Domain of PARP-1 Is Required for Immunoglobulin Gene Conversion. *PLoS Biol* **8**: e1000428.

Palmer WH, Jia D, Deng W-M (2014). Cis-interactions between Notch and its ligands block ligand-independent Notch activity. *Elife* **3**.

Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A *i sur.* (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 18261–18266.

Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M *i sur.* (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* **13**: 1203–1210.

Patel N, Castillo M, Rameshwar P (2007). An in vitro method to study the effects of hematopoietic regulators during immune and blood cell development. *Biol Proced Online 2007 91* **9**: 56.

PDQ Adult Treatment Editorial Board (2002). *Adult Acute Myeloid Leukemia Treatment (PDQ®): Patient Version*. *PDQ Cancer Inf Summ* at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389377>.

Peixoto A, Monteiro M, Rocha B, Veiga-Fernandes H (2004). Quantification of Multiple Gene Expression in Individual Cells. *Genome Res* **14**: 1938–1947.

Pellegrino M, Sciambi A, Treusch S, Durruthy-Durruthy R, Gokhale K, Jacob J i sur. (2018). High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics. Genome Res 28: 1345–1352.

Penton AL, Leonard LD, Spinner NB (2012). Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* **23**: 450–457.

Pillai S, Cariappa A (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* **9**: 767–777.

Pintar A, Biasio A De, Popovic M, Ivanova N, Pongor S (2007). The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference? *Biol Direct* **2**: 19.

Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F (2013). Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol* **13**: 427–437.

Ran Y, Hossain F, Pannuti A, Lessard CB, Ladd GZ, Jung JI *i sur.* (2017). γ-Secretase inhibitors in cancer clinical trials are pharmacologically and functionally distinct. *EMBO Mol Med* **9**: 950–966.

Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ (2011). Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* **11**: 338–351.

Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* **67**: 687–99.

Robert I, Dantzer F, Reina-San-Martin B (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* **206**: 1047–1056.

Robinson SC, Klobucar K, Pierre CC, Ansari A, Zhenilo S, Prokhortchouk E *i sur.* (2017). Kaiso differentially regulates components of the Notch signaling pathway in intestinal cells. *Cell Commun Signal* **15**: 24.

Rosado MM, Bennici E, Novelli F, Pioli C (2013). Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. *Immunology* **139**: 428–437.

Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Ianni M Di, Fettucciari K *i sur.* (2009). Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* **113**: 856–865.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Hoff MJB *i sur.* (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**: e45–e45.

Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC (2002). Induction of T Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells by Delta-like-1 In Vitro. *Immunity* **17**: 749–756.

Scott DW, Gascoyne RD (2014). The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev*

Cancer **14**: 517–534.

Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE *i sur.* (2010). CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy. *Cancer Res* **70**: 10288–10298.

Sjöqvist M, Andersson ER (2017). Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate. *Dev Biol doi: 10.1016/j.ydbio.2017.09.032*.

Somasundaram R, Prasad MAJ, Ungerbäck J, Sigvardsson M (2015). Transcription factor networks in B-cell differentiation link development to acute lymphoid leukemia. *Blood* **126**: 144–152.

Song C, Gowda C, Pan X, Ding Y, Tong Y, Tan B-H *i sur.* (2015). Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia. *Blood* **126**: 1813–22.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**: 58–62.

Sprinzak D, Lakhanpal A, Lebon L, Santat L, Fontes ME, Anderson G *i sur.* (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* **465**: 86–90.

Stanley P, Okajima T (2010). Roles of Glycosylation in Notch Signaling. *Curr Top Dev Biol* **92**: 131–164.

Stępnik M, Spryszyńska S, Gorzkiewicz A, Ferlińska M (2017). Cytotoxicity of anticancer drugs and PJ-34 (poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitor) on HL-60 and Jurkat cells. *Adv Clin Exp Med* **26**: 379–385.

Strobl LJ, Höfelmayr H, Stein C, Marschall G, Brielmeier M, Laux G *i sur.* (1997). Both Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 (EBNA2) and activated Notch1 transactivate genes by interacting with the cellular protein RBP-J kappa. *Immunobiology* **198**: 299–306.

Sulis ML, Williams O, Palomero T, Tosello V, Pallikuppam S, Real PJ *i sur.* (2008). NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood* **112**: 733–740.

Sun L, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J *i sur.* (1999). Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* **5**: 2112–20.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *i sur.* (International Agency for

Research on Cancer: Lyon, 2017). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*.

Taghon TN, David ES, Zúñiga-Pflücker JC, Rothenberg E V. (2005). Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev* **19**: 965–978.

Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, Gulino A, *i sur.* (2008). Notch signaling and diseases: An evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1782**: 489–497.

Tax FE, Yeargers JJ, Thomas JH (1994). Sequence of C. elegans lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of Drosophila. *Nature* **368**: 150–154.

Tohda S, Kogoshi H, Murakami N, Sakano S, Nara N (2005). Diverse effects of the Notch ligands Jagged1 and Delta1 on the growth and differentiation of primary acute myeloblastic leukemia cells. *Exp Hematol* **33**: 558–63.

Trifonova R, Small D, Kacer D, Kovalenko D, Kolev V, Mandinova A *i sur.* (2004). The Non-transmembrane Form of Delta1, but Not of Jagged1, Induces Normal Migratory Behavior Accompanied by Fibroblast Growth Factor Receptor 1-dependent Transformation. *J Biol Chem* **279**: 13285–13288.

Tsao P-N, Wei S-C, Huang M-T, Lee M-C, Chou H-C, Chen C-Y *i sur.* (2011). Lipopolysaccharide-induced Notch signaling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response. *J Biomed Sci* **18**: 56.

Valdor R, Schreiber V, Saenz L, Martínez T, Muñoz-Suano A, Dominguez-Villar M *i sur.* (2008). Regulation of NFAT by poly(ADP-ribose) polymerase activity in T cells. *Mol Immunol* **45**: 1863–1871.

Varnum-Finney B, Wu L, Yu M, Brashem-Stein C, Staats S, Flowers D *i sur.* (2000). Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling. *J Cell Sci* **113**: 4313–8.

Vidaković M, Gluch A, Qiao J, Oumard A, Frisch M, Poznanović G *i sur.* (2009). PARP-1 Expression in the Mouse is Controlled by an Autoregulatory Loop: PARP-1 Binding to an Upstream S/MAR Element and to a Novel Recognition Motif in its Promoter Suppresses Transcription. *J Mol Biol* **388**: 730–750.

Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJW (2001). Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing

Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. *Mol Endocrinol* **15**: 681–694.

Wang H, Zang C, Taing L, Arnett KL, Wong YJ, Pear WS *i sur.* (2014). NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 705–10.

Weinmaster G (1997). The Ins and Outs of Notch Signaling. *Mol Cell Neurosci* **9**: 91–102.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C *i sur.* (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**: 269–71.

Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, Oscier DG, Pratt G, Dyer MJS *i sur.* (2010). The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* **116**: 4578–4587.

Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**: 567–581.

Witkowski MT, Cimmino L, Hu Y, Trimarchi T, Tagoh H, McKenzie MD *i sur.* (2015). Activated Notch counteracts Ikaros tumor suppression in mouse and human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **29**: 1301–1311.

Yeh E, Dermer M, Commisso C, Zhou L, McGlade CJ, Boulianne GL (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during Drosophila development. *Curr Biol* **11**: 1675–9.

Yoshida T, Landhuis E, Dose M, Hazan I, Zhang J, Naito T *i sur.* (2013). Transcriptional regulation of the Ikzf1 locus. *Blood* **122**: 3149–59.

Zhang L, Dang R-J, Yang Y-M, Cui D-C, Li P, Ni Y-L *i sur.* (2016). Delta-Like-1 Changes the Immunomodulatory Property of OP9 Cells. *Stem Cells Int* **2016**: 1628352.

Zhang P, Yang Y, Nolo R, Zweidler-McKay PA, Hughes DPM (2010). Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness. *Oncogene* **29**: 2916–2926.

Zolkiewska A (2008). ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2056–2068.

Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC *i sur.* (2005). Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood* **106**: 3898–3906.

Internetske stranice

http://www.ensembl.org/index.html

http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

http://www.thermofisher.com/hr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html

http://engels.genetics.wisc.edu/amplify

PRILOZI

Prilog 1. Popis dizajniranih početnica

Gen	**Slijed nukleotida**	**Duljina očekivanog fragmenta**
HPRT1	F1: TGCTCGAGATGTGATGAAGG F2: CTTTGCTGACCTGCTGGATT R: TCCCCTGTTGACTGGTCATT	192 (117)
NOTCH2	F1: AAGCAGAGTCCCAGTGCCTA F2: CTGGCAACACGCATTACT R: GGCACTCATCCACTTCATAC	330 (189)
HES1	F1:AACACGACACCGGATAAACC F2:GAGCACAGAAAGTCATCAAAGC R:CCGCGAGCTATCTTTCTTCA	150 (117)
PARP1	F1: GCTCCTGAACAATGCAGACA F2: TGGAAATGCTTGACAACCTG R: CATTGTGTGTGGTTGCATGA	233 (198)
PAX5	F1:AACACGACACCGGATAAACC F2:GAGCACAGAAAGTCATCAAAGC R:CCGCGAGCTATCTTTCTTCA	212 (183)
AIOLOS (IKZF3)	F1: GCCCAGCCAATGAAGATGAA F2: GAAGAGCCTGAAATCCCTTAC R: CCAGTATGGCTTCGCTTATG	291 (185)
NOTCH1	F: GCAGTTGTGCTCCTGAAGAA R: GTCCATATGATCCGTGATGT	152
NOTCH3	F: CTTGGGAAATCAGCCTTACA R: ATCTCACGGTTGGCAAAG	188
HEY1	F: ACCGTGGATCACCTGAAA R: GGAAGCGTAGTTGTTGAGATG	201
DELTEX1	F: CCCTCGCCACTGCTATCTAC	157

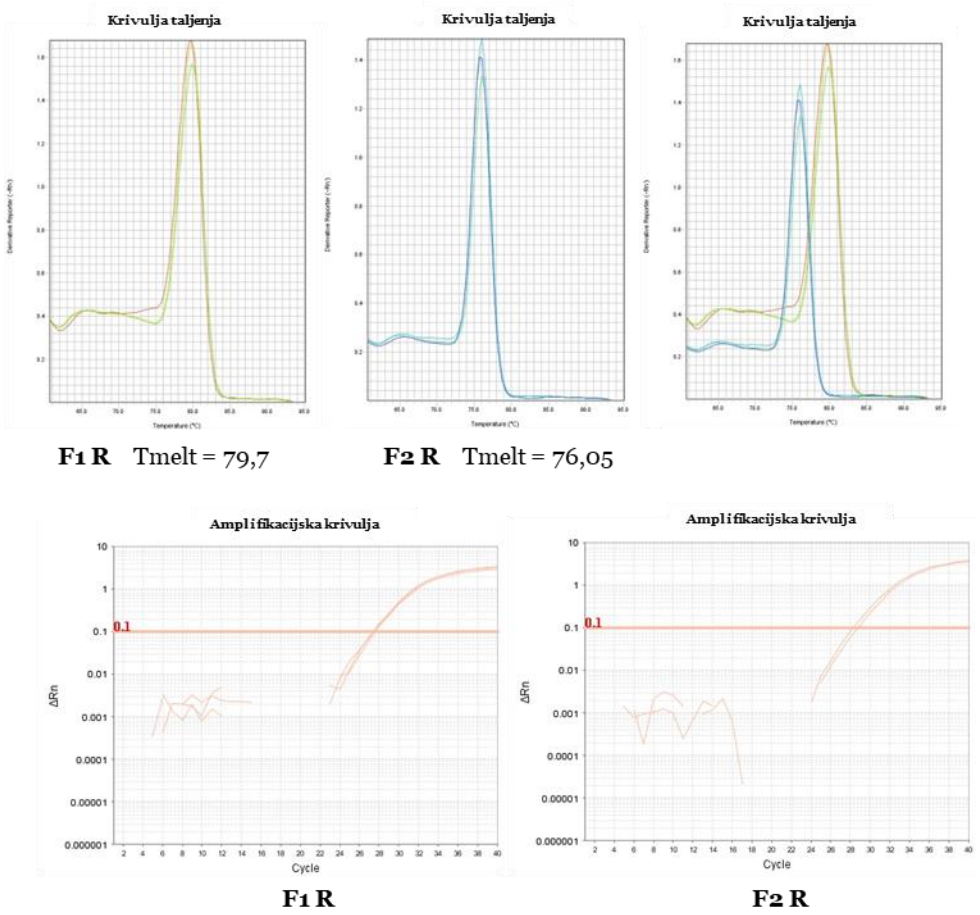
	R: GGTCTTGTGGTGGATCTCGT	
RUNX1	F: GGCTGGCAATGATGAAAACT R: TGAAGCTTTTCCCTCTTCCA	122
NUMB	F: GATGCCAAGAAAGCTGAAAC R: CTCATTGATGCGTAGGGATAG	258
DLL1	F: GAGAAGGATGAGTGCGTCATAG R: CCTCCTCTTCAGCAGCATTC	126
JAGGED1	F: CAACACAGGCCCTGACAAAT R: TGGGGAACACTCACACTCAA	154
PARP1	F: TGGAAATGCTTGACAACCTG R: CATTGTGTGTGGTTGCATGA	198
PARG1	F: GCATGCTACAGGTGGATTT R: CTCAGCATAGCCTGTGTATTC	197
IKAROS (IKZF1)	F: CACTCCGTTGGTAAACCTC R: CCTATCTTGCACAGGTCTTC	188
PU.1	F: GAGCCATAGCGACCATTAC R: TATCGAGGACGTGCATCT	161
YY1	F: GGATAACTCGGCCATGAGAAA R: CGCAAATTGAAGTCCAGTGAAA	189
c-MYC	F: CTGCTTAGACGCTGGATTT R: CTCCTCGTCGCAGTAGAAA	140
TGFβ	F: GACACCAACTATTGCTTCAG R: AGAAGTTGGCATGGTAGCCC	124
EBNA2	F: TTCCACCTATGCCATTACCC R: GCCTTGAGTCTTAGAGGGTT	161
NICD-kloniranje	F: GCAACGTGCTGGTTATTGTG R: TTTACCGTCTAGATTACTTGTCATCGTCGTCCTT	2515
JAGGED-kloniranje	F: ATGCGTTCCCCACGGAC R: CTATACGATGTACTCCATTCGG	3657

Prilog 2. Usporedba originalnog protokola za višestruku direktnu analizu iz jedne stanice prema Peixoto *i sur.*, 2004 i prilagođenog protokola za višestruku direktnu analizu iz malog broja stanica.

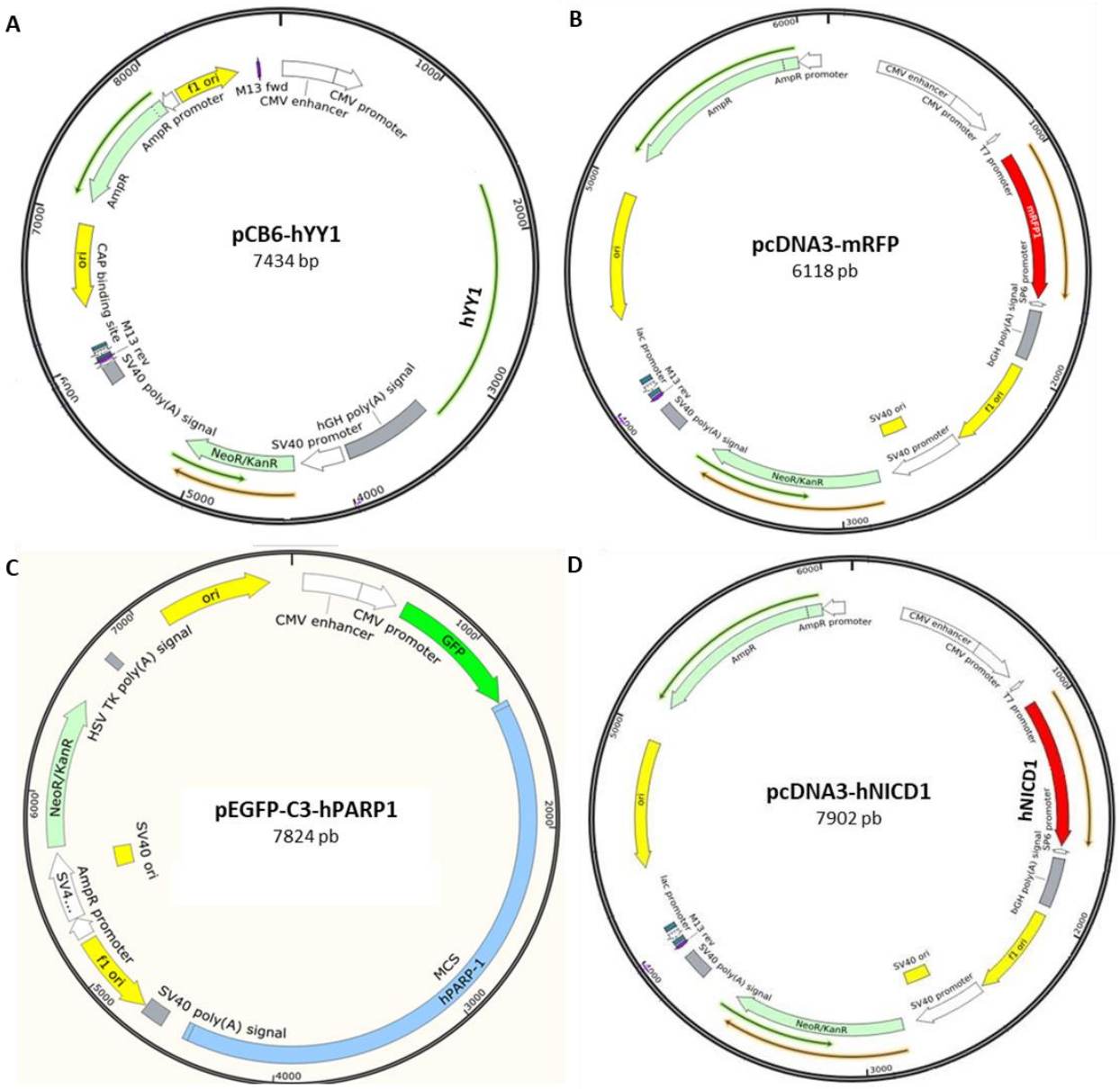
Originalni protokol	**Prilagođeni protokol**
Reverzna transkripcija	**Reverzna transkripcija**
1 stanica lizirana je u 5 µl PBS-DEPC hlađenjem na -80 ° C, nakon čega je lizat zagrijavan na 65 ° C kroz 2 minute. Nakon hlađenja na + 4 ° C, RNA se specifično retrotranskribira 1 sat na 37 ° C dodavanjem 10 µl smjese koja sadrži 0,13 µM specifične 3' početnice (konačna koncentracija 86 nM). U reakciju je dodano: 50 mM KCl, 10 mMTris-HCl at pH 8.3 (Applied Biosystems), 3.3 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems), 1 mM dNTP (Pharmacia Biotech), 39 U inhibitora RNAza (Stratagene) 11.5 U of MuLV Reverzne transkriptaze (Applied Biosystems) u ukupnom volumenu od 15 µl. Reakcija je zaustavljena 3 min inkubacijom na 95 °C.	**500 stanica** lizirano je u 5 µl PBS-DEPC hlađenjem na -80 ° C, nakon čega je lizat zagrijavan na 65 ° C kroz 2 minute. Nakon hlađenja na + 4 ° C, RNA se specifično retrotranskribira **50 min** na **42 ° C** dodavanjem 0,4 µl smjese koja sadrži 5 µM specifične 3' početnice (konačna koncentracija **100 nM**). U reakciju je dodano: First Strand Buffer (Gibco) [50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$], **0,01 M DTT** (Gibco BRL), **500 µM** dNTP (Applied Biosystems), **20 U** inhibitora RNAza(Agilent) **50 U** MuLV Reverzne transkriptaze (Applied Biosystems) u ukupnom volumenu od **20** µl. Reakcija je zaustavljena 15 min inkubacijom na 70 °C.
PCRI	**PCRI**
Ukupna cDNA dobivena reverznom transkripcijom korištena je u idućem koraku	**2,5 µL** cDNAs dobivene reverznom transkripcijom korišteno je u idućem koraku

umnažanja. Prvi korak PCR reakcije sastoji se od denaturacije pri 95 °C tijekom 10 minuta a zatim slijedi 15 ciklusa umnažanja (45 s na 95°C, 1 min na 60°C i 1 min 30 s na 72°C). Reakcijska smjesa sadrži 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pri pH 8.3 (Applied Biosystems), 2 mM MgCl2 (Applied Biosystems), 0.2 mM GeneAmp dNTPs (Applied Biosystems), 3 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), i 0.015 μM specifičnih početnica u ukupnom volumenu od 85 μL.	umnažanja. Prvi korak PCR reakcije sastoji se od denaturacije pri **94°C** tijekom **5** minuta a zatim slijedi 15 ciklusa umnažanja (30 s na 94°C, 30 min na 58°C i 20 s na 72°C). Reakcijska smjesa sadrži 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pri pH 8.3 (Sigma Aldrich), 2 mM MgCl2 (Sigma Aldrich), 0.2 mM dNTPs (Applied Biosystems), 1 U **Taq DNA Polymerase** (Sigma Aldrich) i 0.015 μM specifičnih početnica u ukupnom volumenu od **25 μL.**
PCR II	**PCR II**
2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4 μL kalupa iz prethodne reakcije (PCR I) i početnice koncentracije 75 nM u ukupnom volumenu od 20-μL . Korišten je uređaj ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Nakon denatuacije na 95°C kroz 10 min, uslijedio je niz od 60 ciklusa (30 s na 95°C, 30 s na 60°C i 45 s na 72°C). Ciklus praga (Ct) određen je na linearnom dijelu amplifikacijske krivulje PCR-a pomoću softvera Sequence Detector version 1.7 (Applied Biosystems).	2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), **1 μL** kalupa iz prethodne reakcije (PCR I) i početnice koncentracije **150 nM** u ukupnom volumenu od 20-μL . Korišten je uređaj ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Nakon denatuacije na 95°C kroz 10 min, uslijedio je niz od 40 ciklusa (**15 s na 95°C, 1 min na 58°C**). Ciklus praga (Ct) određen je na linearnom dijelu amplifikacijske krivulje PCR-a pomoću softvera 7500 Software version 2.0.6. (Applied Biosystems).

HPRT



Prilog 3. Validacija početnica za višestruku direktnu analizu iz malog broja stanica metodom PCR u stvarnom vremenu na primjeru početnica za gen HPRT1. F1R i F2R: parovi početnica potrebni za polu-ugnježđeni PCR



Prilog 4. Mape korištenih plazmida. A: pYY1 (dar Bernharda Lüschera, Aachen); B: pRFP (Addgene #13032); C: pGFP-hPARP (dar Valerie Schreiber, Strassbourg); D: pNICD1.

ŽIVOTOPIS

Luka Horvat rođen je 03. srpnja 1990. godine u Zagrebu, gdje završava Osnovnu školu Antuna Mihanovića, a potom XV. gimnaziju. Preddiplomski studij molekularne biologije završio je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2012. godine s temom "Epigenetički i molekularni mehanizmi tumorigeneze uzrokovane duhanskim dimom".

Diplomski studij molekularne biologije također je završio na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kao i studij molekularne biotehnologije na Sveučilištu u Orleansu, Francuska 2014. godine s temom "Ultrazvukom i mikromjehurićima potpomognuta dostava siRNA u stanice raka dojke".

Od 2015. godine zaposlen je kao stručni suradnik na Zavodu za molekularnu biologiju pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a od 2017. kao asistent, financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

2015. godine upisuje poslijediplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s radom na projektu ″Notch in hematopoietic stem cell differentiation and leukemia development″, financiranom od strane HRZZ pod vodstvom prof. Mariastefanije Antice i izv. prof. Maje Matulić.

Sudjelovao je u izvođenju praktične nastave na kolegijima: Molekularna biologija stanice, Kultura animalnih stanica, Molekularna dijagnostika, Medicinska genetika i Metode istraživanja u molekularnoj biologiji.

Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Pohađao je više međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova i radionica. Objavio je dva rada citirana u Current Contets.

Publikacije:

Horvat L, Antica M, Matulić M (2018) Effect of Notch and PARP Pathways' Inhibition in Leukemic Cells. Cells *7* (6), 58

Horvat L, Skelin J, Puškarić BJ, Feliciello I, Heckel D, Madunić J, Kardum-Skelin I, Matulić M, Radić-Krišto D, Antica M (2018) Notch pathway connections in primary leukaemia samples of limited size. Translational Medicine Communications 3:8

Madunić J, Horvat L, Majstorović I, Jodłowska I, Antica M, Matulić M (2017); Sodium Salicylate Inhibits Urokinase Activity in MDA MB-231 Breast Cancer Cells. Clinical breast cancer 17 (8), 629-637

Delalande A, Manta S, Horvat L, Ezzine S, Bessodes M, Midoux P, Jaffres P-A, Mignet N, Pichon C (2015) Ultrasound-Targeted Delivery of Chemotherapeutic Drug and Nucleic Acids by Gas-Filled Cationic Liposomes. Molecular Therapy 23, S107