

# Uloga retinoične kiseline u diferencijaciji matičnih stanica sisavaca

---

Fašnik, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:242514>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Dora Fašnik

**Uloga retinoične kiseline u diferencijaciji  
matičnih stanica sisavaca**

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Dora Fašnik

**The role of retinoic acid in mammalian  
stem cell differentiation**

Bachelor thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Romane Gračan.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Završni rad

## Uloga retinoične kiseline u diferencijaciji matičnih stanica sisavaca

Dora Fašnik

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom su radu prikazana dosadašnja istraživanja i saznanja o učincima retinoične kiseline koji potiču diferencijaciju matičnih stanica kod sisavaca. Retinoična kiselina je morfogen koji ima širok raspon funkcija tijekom embrionalnog razvoja organizma. Na diferencijaciju matičnih stanica može djelovati na razini genoma ili preko izvangenomskih mehanizama. Također ima velik potencijal u primjeni u terapijske svrhe protiv teških i malignih bolesti. No poznat je i njen oprečni utjecaj na stimulaciju proliferacije stanica. Cilj ovog rada bio je obuhvatiti nove zaključke u ovom širokom području i otvoriti pitanja za buduća istraživanja ključna za bolje razumijevanje mehanizama retinoične kiseline i njene suradnje s drugim molekulama u staničnom mikrookolišu koje oblikuju staničnu sudbinu.

Ključne riječi: receptori retinoične kiseline, mikroRNA, fosforilacija, retinoilacija, terapija protiv raka

(24 stranice, 7 slika, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bachelor thesis

# The role of retinoic acid in mammalian stem cell differentiation

Dora Fašnik

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This paper presents the current research and findings on the effects of retinoic acid that promote the differentiation of stem cells in mammals. Retinoic acid is a morphogen with a wide range of functions during the embryonic development of an organism. It can influence stem cell differentiation at the genomic level or through non-genomic mechanisms. Additionally, it holds significant potential for therapeutic applications against severe and malignant diseases. However, its contradictory impact on the stimulation of cell proliferation is also well-known. The aim of this paper was to encompass new conclusions in this broad field and to raise questions for future research crucial for a better understanding of the mechanisms of retinoic acid and its interactions with other molecules in the cellular microenvironment that shape cell fate.

Keywords: retinoic acid receptors, mikroRNA, fosforilation, retinoilation, cancer therapy  
(24 pages, 7 figures, 42 references, original in: croatian language)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. MATIČNE STANICE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. RETINOIČNA KISELINA .....</b>	<b>2</b>
<b>2. MOLEKULARNI MEHANIZMI DIFERENCIJACIJE MATIČNIH STANICA POSREDOVANE RETINOIČNOM KISELINOM .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. RECEPTORI RETINOIČNE KISELINE .....</b>	<b>4</b>
<i>2.1.1. Fosforilacija receptora retinoične kiseline u diferencijaciji matičnih stanica .....</i>	<i>8</i>
<b>2.2. DJELOVANJE RETINOIČNE KISELINE KROZ DRUGE SIGNALNE PUTEVE .....</b>	<b>9</b>
<i>2.2.1. FGF signalni put u diferencijaciji matičnih stanica u neuralnu staničnu liniju</i>	<i>10</i>
<i>2.2.2. Smad signalni put u diferencijaciji matičnih stanica u germinativnu staničnu liniju .....</i>	<i>11</i>
<b>2.3. UTJECAJ RETINOIČNE KISELINE NA MIKRORNA EKSPRESIJU U DIFERENCIJACIJI MATIČNIH STANICA .....</b>	<b>13</b>
<b>3. PRIMJENA RETINOIČNE KISELINE U TERAPIJSKE SVRHE .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. UTJECAJ RETINOILACIJE NA DIFERENCIJACIJU STANICA AKUTNE PROMIJELOCITNE LEUKEMIJE .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. DVOJAKA FUNKCIJA RETINOIČNE KISELINE .....</b>	<b>16</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>18</b>
<b>5. LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>24</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Matične stanice

Matične stanice jedinstvene su i nespecializirane stanice iz kojih mogu nastati raznolike skupine specializiranih stanica. Njihove su glavne karakteristike mogućnost samoobnavljanja i sposobnost stvaranja diferenciranih stanica, tj. potencijal da se diferenciraju u jednu ili više staničnih linija. Samoobnavljanje podrazumijeva da njihovom diobom nastaju stanice kćeri identične majčinskoj stanici. Matične stanice imaju hijerarhiju potencijala, a kao totipotentne, tijekom embriogeneze, mogu se definirati jedino zigota i stanice nastale prvim dvjema diobama zigote jer one mogu stvoriti i embrij i embrionalni dio posteljice – trofoblast – koji neće biti dio samog embrija. Daljnjim diobama i nastankom blastociste od trećeg do sedmog dana nakon oplodnje, stanice embrioblasta postaju pluripotentne matične stanice iz kojih se razvija embrij, a mogu se diferencirati u bilo koju stanicu tri zametna listića. Iz embrioblasta tj. unutarnje mase stanica (ICM, *inner cell mass*) moguće je izolirati matične stanice koje se nazivaju embrionalne matične stanice. Te stanice će *in vivo* nestati sedmog dana od oplodnje jer će se iz njih razviti stanice zametnih listića, ali se nakon izolacije mogu uzgajati *in vitro* i njihov potencijal se održava neodređeno vrijeme. Također, postoje multipotentne matične stanice iz kojih se mogu razviti samo određene stanične linije, tu spadaju npr. hematopoetske matične stanice koje mogu diferencirati u eritrocite, limfocite, mastocite, trombocite, makrofage i granulocitne leukocite. U odraslih se jedinki matične stanice nalaze u raznim tkivima i služe u održavanju homeostaze tkiva jer diobama stvaraju specializirane stanice tkiva. Matične stanice odraslih tako mogu biti multipotentne poput hematopoetskih matičnih stanica ili unipotentne – mogu stvarati samo jednu staničnu liniju. Unipotentne matične stanice neki ni ne smatraju matičnim stanicama, već samo progenitorima specializiranih, diferenciranih stanica (Foster i sur. 2002). Na diobu, diferencijaciju i brojnost matičnih stanica uvelike utječe mikrookoliš u kojem se one nalaze u specializiranim prostorima u tkivima tj. u nišama matičnih stanica (Lanza i sur. 2009). Važno je spomenuti da se već diferencirane stanice odraslih mogu reprogramirati i aktivirati gene odgovorne za pluripotentnost, a ponašaju se kao embrionalne matične stanice te ih nazivamo induciranim matičnim stanicama (Takahashi i Yamanaka 2006). Osim što su bitne u embrionalnom razvoju i održavanju tkivne homeostaze odraslih jedinki, matične stanice danas su sve popularnija tema kliničkih istraživanja vezanih za njihove terapijske potencijale u liječenju dijabetesa, srčanih i neurodegenerativnih bolesti, genskoj terapiji, a još uvijek se otkrivaju i nove moguće primjene (Lanza i sur. 2009).

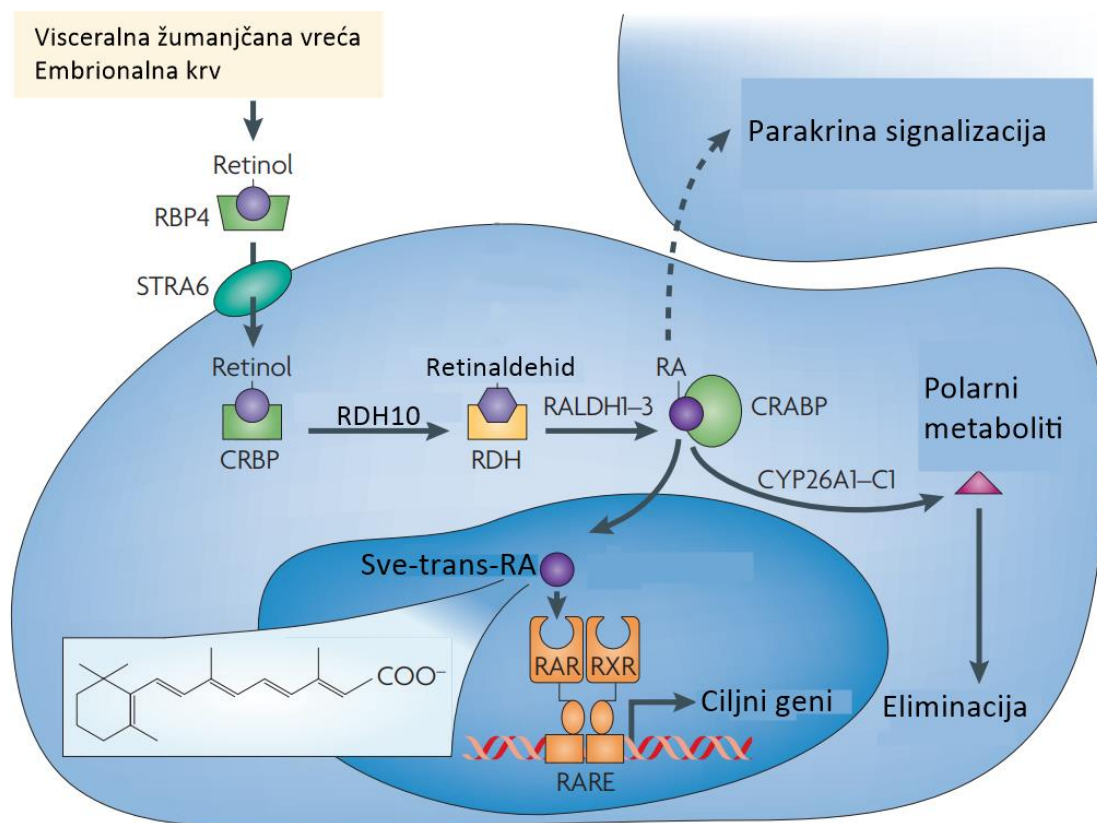


## 1.2. Retinoična kiselina

Retinoična kiselina (RA, *retinoic acid*) vrlo je važna tvar bez koje je embrionalni razvoj nemoguć. Derivat je vitamina A i tijelo ju samo proizvodi iz vitamina A unesenog putem hrane. Regulira embrionalni rast i genetske obrasce, a manjak vitamina A tijekom razvoja može uzrokovati malformacije, dok kod odraslih i dalje ima utjecaja na organizam, a prvenstveno na plodnost, vid, neurodegenerativne bolesti i još mnogo toga (Niederreither i Dollé 2008). Retinoidi se u organizam unose prehranom u obliku retinola (vitamin A), retinil estera ili kao karotenoid  $\beta$ -karoten. Retinol se prenosi krvlju putem serumskog retinol-vezujućeg proteina (sRBP), a ulazak retinola u stanicu omogućuju transmembranski protein Stra6, koji veže kompleks retinola i sRBP, te enzim lecitin:retinol-acil-transferaza (LRAT), koji esterificira retinol u stanici pa potpomaže pozitivnom prinosu retinola u stanicu. U embrionalnom razvoju placentalnih embrija glavni izvor retinola je majčinski plazmatski retinol te je izrazito bitna uravnotežena prehrana majke, a unutar stanica retinol se veže za stanični retinol-vezujući protein (CRBP) te se u retinoičnu kiselinu prevodi u dva koraka. Retinol-dehidrogenaza-10 je enzim ovisan o  $\text{NAD}^+$ , a služi kao primarni enzim za prevođenje retinola u retinaldehid, dok oksidaciju retinaldehida u retinoičnu kiselinu provodi retinaldehid-dehidrogenaza-2 (Gudas i Wagner 2011). Nastala retinoična kiselina mala je lipofilna molekula i može djelovati intrakrino u stanici koja ju je proizvela ili parakrino na susjedne stanice, može služiti kao ligand za jezgrine receptore ili dalje metabolizirati u polarnije spojeve i degradirati se u prisustvu citokrom P 26 enzima. Unutar stanice retinoičnu kiselinu vežu i prenose stanični RA-vezujući proteini – CRABP (Slika 1). Oblik retinoične kiseline koji služi kao ligand za jezgrine receptore je sve-trans-retinoična kiselina (Niederreither i Dollé 2008).

Retinoična kiselina neophodna je molekula u embriogenezi svtkovaca. Preko kontrole ekspresije Hox gena djeluje na razvoj anteriorno-posteriorne osi tijela, sudjeluje u razvoju neuralne cijevi s fokusom na prednji dio embrija i razvoj središnjeg živčanog sustava. Njen utjecaj je vidljiv i u formaciji udova, srca, pluća i očne leće. Bitan je faktor u hematopoezi i djeluje na reproduktivne karakteristike jedinke. Iz tih podataka može se zaključiti da je retinoična kiselina iznimno bitan čimbenik u rastu i razvoju sisavaca i da je život bez nje nemoguć. No, količina retinoične kiseline mora se strogo regulirati jer njen višak ili manjak djeluje teratogeno, odnosno može uzrokovati razvoj urođenih mana. Retinoična kiselina u prekomjernoj količini može poremetiti signalne puteve unutar stanica u razvoju i uzrokovati promjene u ekspresiji gena što može dovesti do malformacija u organizmu. Uravnotežena razina retinoične kiseline također je važna za pravilan obrazac diferencijacije stanica.

Teratogeni efekti retinoične kiseline su kraniofacijalne abnormalnosti vezane za nepravilan razvoj ušiju ili dismorfije lica, defekti u živčanom sustavu zbog poremećaja u razvoju neuralne cijevi, srčani defekti, malformacije timusa i paratiroidne žlijezde što utječe na pogreške u imunološkom i endokrinom sustavu (Lee i sur. 2012). Danas je retinoična kiselina, ili njeni derivati, vrlo prisutna u kozmetičkoj industriji te je izrazito bitno osvijestiti široku javnost o opasnostima prekomjerne primjene pripravaka koji je sadrže, pogotovo kod trudnica. Osim preko kozmetičkih pripravaka, bitno je i da se tijekom trudnoće ne unosi prevelika količina hrane bogate vitaminom A, ali većinski se to odnosi na dodatke prehrani. Oprez u trudnoći je ključan kako se s retinoičnom kiselinom ne bi ponovila katastrofa uzrokovana korištenjem talidomida protiv mučnine u trudnica tijekom 1950-tih što je rezultiralo mnogim malformacijama u djece koje su bile i fizičke i mentalne, ali i dogodilo se i puno pobačaja te je puno djece mrtvorodeno (Vargesson 2015).



Slika 1 - Sinteza, metabolizam i regulacija signalizacije retinoida u embrionalnim stanicama. Kratice: retinol-vezujući protein-4 (RBP4), stanični retinol-vezujući protein (CRBP), retinol-dehidrogenaza (RDH), retinaldehid-dehidrogenaza (RALDH), retinoična kiselina (RA), stanični retinoična kiselina-vezujući protein (CRABP), citokrom P26 (CYP26), receptor retinoične kiseline (RAR), receptor reksinoida (RXR), RAR-vezujuća sekvenca (RARE). (Preuzeto i prilagođeno iz Niederreither i Dollé, 2008)

Vrlo važna funkcija retinoične kiseline je sposobnost indukcije diferencijacije u nediferenciranim stanicama kao što su matične stanice. U normalnim količinama retinoična kiselina preko diferencijacije uzrokuje pravilan embrionalni razvoj sisavaca. Fokus ovog rada pregled je dosadašnjih saznanja o mehanizmima pomoću kojih retinoična kiselina uzrokuje diferencijaciju i specijalizaciju pluripotentnih stanica. Te informacije bitne su za bolje razumijevanje embrionalnog razvoja sisavaca, ali osim toga mogu imati vrlo važnu primjenu u biomedicinskim istraživanjima. Razumijevanje točnih mehanizama diferencijacije stanica moglo bi se primjenjivati u regenerativnoj i transplantacijskoj medicini, a sve je više fokus na retinoičnoj kiselini u terapiji protiv malignih tumora – diferencijacijom matičnih stanica raka zaustavilo bi se njihovo nekontrolirano dijeljenje (Takahashi i sur. 2022). Retinoična kiselina već je u primjeni kod liječenja promijelocitne leukemije (Breitman i sur. 1980).

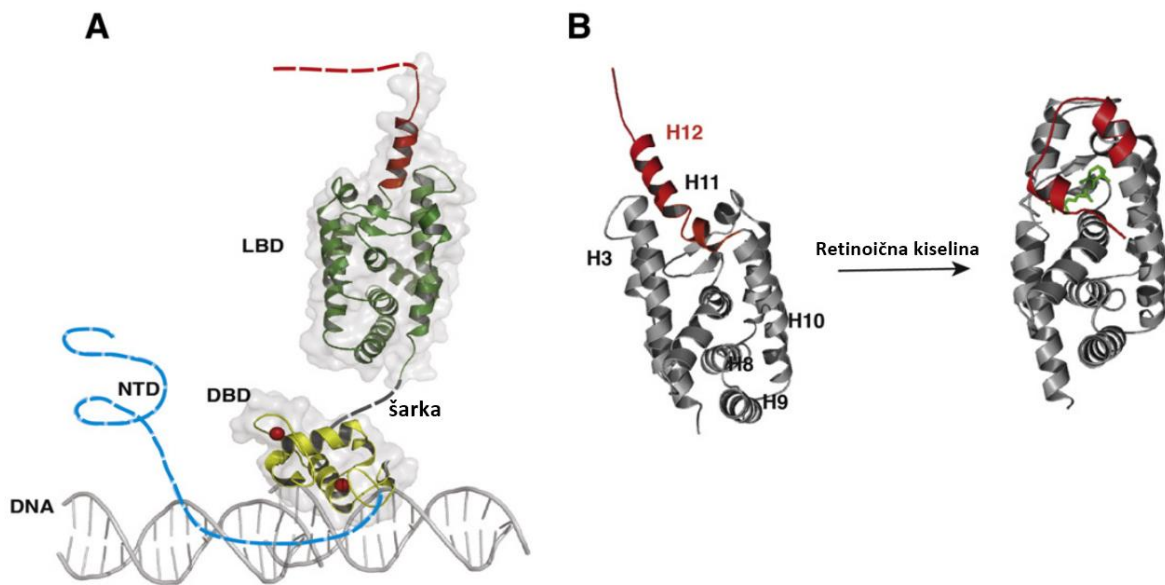
## **2. MOLEKULARNI MEHANIZMI DIFERENCIJACIJE MATIČNIH STANICA POSREDOVANE RETINOIČNOM KISELINOM**

Za diferencijaciju matičnih stanica potrebna je potpuna promjena u genskoj ekspresiji. To može biti putem djelovanja različitih transkripcijskih faktora koji uzrokuju aktivaciju ekspresije ili će inhibirati ekspresiju nekog gena. Epigenetičke promjene poput metilacije ili fosforilacije također igraju veliku ulogu u načinu slaganja kromatina koji može postati rjeđe pakirani eukromatin, s kojeg je moguća transkripcija, ili gušće pakirani heterokromatin kod kojeg se transkripcijska mašinerija ne može vezati. Postoje raznoliki signalni putevi koji sudjeluju u mijenjanju genetičkih uzoraka određene stanične linije, a retinoična kiselina može djelovati samostalno ili u sklopu drugih signalnih puteva kako bi dovela do diferencijacije matičnih stanica te njeni učinci mogu biti genomski ili negenomski.

### **2.1. Receptori retinoične kiseline**

U jezgrama stanica sisavaca postoje tri tipa receptora retinoične kiseline: RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  i RAR $\gamma$ . U prijenosu signala retinoične kiseline djeluju kao heterodimeri uz RXR proteine čiji ligandi su reksinoidi. Kristalografskim analizama utvrđene su strukture RAR-ova te je poznato da imaju varijabilnu N-terminalnu domenu (NTD) čija struktura nije razjašnjena, ali se zna da sadrži evolucijski očuvana mjesta fosforilacije. Centralna DNA-vezujuća domena (DBD) je globularna domena koju formiraju dvije  $\alpha$ -zavojnice i dva Zn<sup>2+</sup> iona. Ligand-vezujuća domena (LBD) nalazi se na C-terminalnom dijelu receptora, a od DBD je odvojena šarkom. Sudjeluje u vezanju liganda, dimerizaciji s RXR receptorima i u interakciji s drugim proteinima, većinom koregulatorima. Sastoji se od 12 konverziranih  $\alpha$ -zavojnica i od  $\beta$ -zavoja, odvojeni su omčama

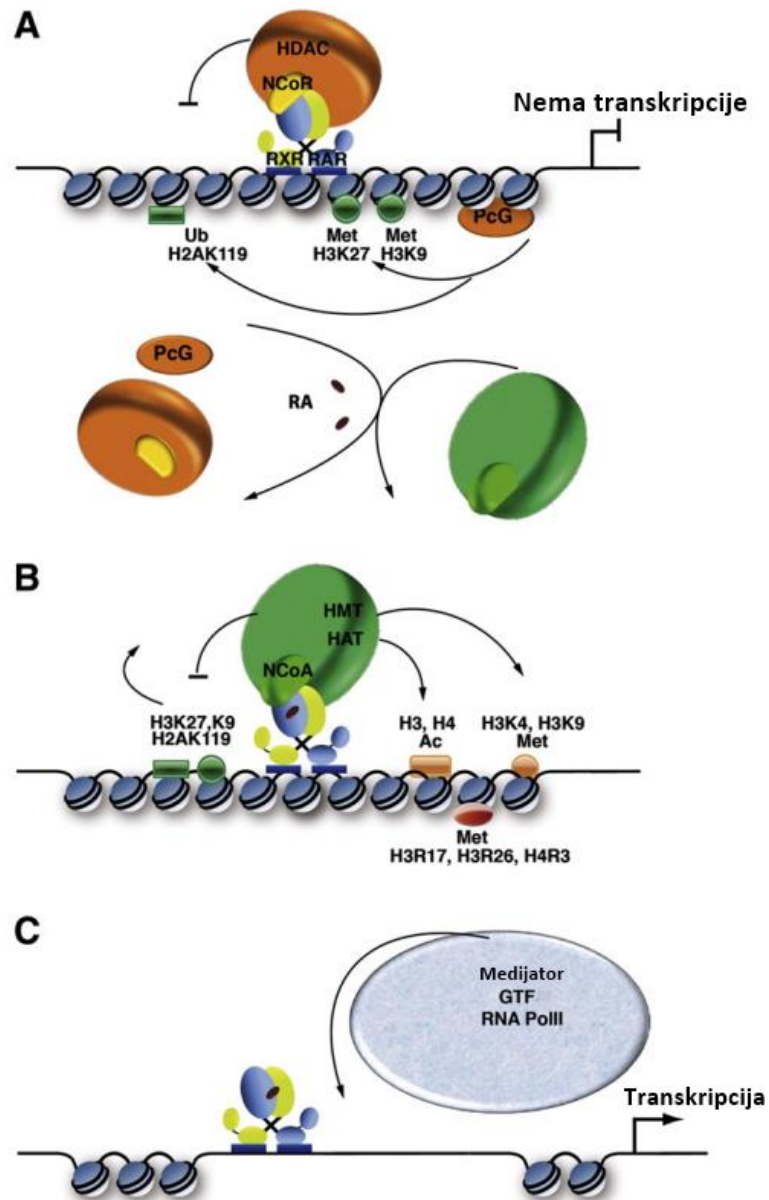
i presavijeni u trosloj. C-terminalna zavojnica je varijabilne konformacije i razlikuje se u svakom receptoru, a promjena njegove konformacije bitna je prilikom vezanja ili otpuštanja regulatornih proteina (Slika 2) (de Lera i sur. 2007).



Slika 2 - A. Struktura receptora retinoične kiseline. Kratice: ligand-vezujuća domena (LBD), DNA-vezujuća domena (DBD), N-terminalna domena (NTD). B. Promjene konformacije receptora uzrokovane vezanjem liganda.  $\alpha$ -zavojnice označene su slovom H i brojevima. (Preuzeto i prilagođeno iz Rochette-Egly, 2015)

U promotorima ciljnih gena nalaze se specifične sekvence nazvane RARE (*Retinoic acid response elements*) koje se sastoje od dva izravna heksamerna ponavljanja koja odvaja od 0 do 8 nukleotida, a postoje i sekvence u kojima su heksamerna ponavljanja invertna (Moutier i sur. 2012). Na RARE motive se preko svojih DNA-vezujućih domena mogu vezati RAR/RXR heterodimeri preko kojih se ostvaruje regulacija transkripcije (Slika 3). Kada nema retinoične kiseline, heterodimeri ostvaruju interakcije s korepresorima koji omogućuju epigenetičku djelatnost histonske deacetilaze kojom se sprečava transkripcija gena zbog kondenzacije kromatina (Perissi i sur. 2010). Ciljni geni retinoične kiseline su također utišani pomoću djelovanja Polycomb grupe proteina koji su u embrionalnim matičnim stanicama izrazito bitni kao inhibitori razvoja gdje sprečavaju diferencijaciju matičnih stanica. U odsutnosti retinoične kiseline, Polycomb proteini oplakuju ciljne gene i represivnim epigenetičkim oznakama sprečavaju njihovu ekspresiju. Dodatkom retinoične kiseline ti proteini će disocirati i doći će do ekspresije gena odgovornih za diferencijaciju stanica (Gillespie i Gudas 2007). Vezanjem retinoične kiseline za RAR dogode se konformacijske promjene koje uzrokuju otpuštanje korepresorskih proteina s receptora što otvara vezna mjesta za koaktivatore steroidnih receptora. Osim što omogućuju ostvarivanje interakcija s drugim aktivatorskim proteinima

također imaju i vlastitu histonsku acetil-transferaznu djelatnost. Dolazi do micanja represivnih oznaka na kromatinu koji se uslijed toga dekoncentrira pa transkripcijska mašinerija ima pristup genima.

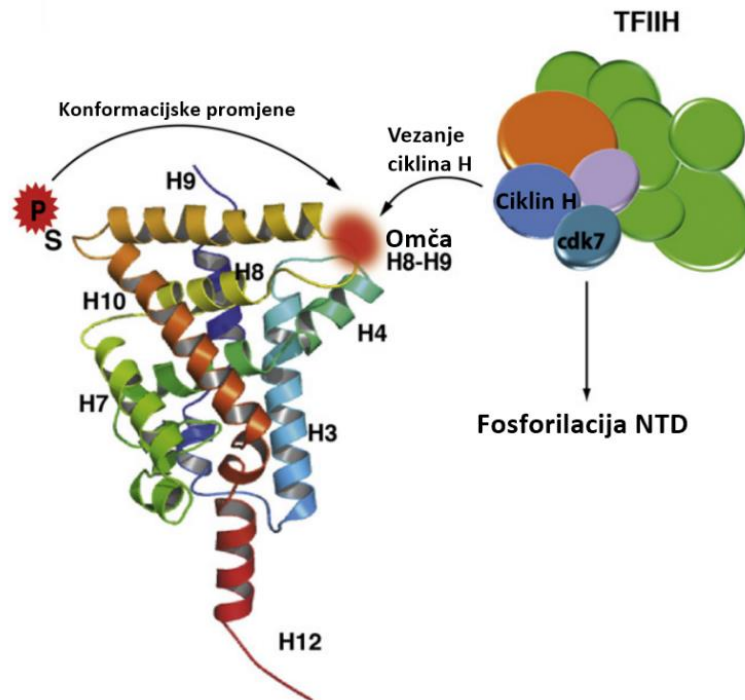


Slika 3 – Regulacija transkripcije ciljnih gena retinoične kiseline. A. U odsutnosti retinoične kiseline transkripcija je utišana korepresorima NCoR uz histonsku deacetilazu HDAC, a Polycomb proteini (PcG) postavljaju represivne oznake na kromatin. B. Disocijacija korepresora vezanjem retinoične kiseline, a vežu se koaktivatori NCoA i proteini koji postavljaju aktivirajuće oznake na kromatin (HMT, HAT). C. Vezanje transkripcijske mašinerije (medijator, RNA polimeraza II i generalni transkripcijski faktori GTF) na promotor. (Preuzeto i prilagođeno iz Rochette-Egly, 2015)

Osim tih promjena u jezgri stanice, retinoična kiselina djeluje već i u samoj citoplazmi tako što aktivira kaskadu kinaza. U nekim stanicama kao što su fibroblasti i stanice leukemije dolazi do

aktivacije MAPK signalnog puta dok u embrionalnim matičnim stanicama, neuronima i Sertolijevim stanicama dolazi do aktivacije Erk signalnog puta (Rochette-Egly 2015). Poznato je da postoje RAR proteini koji se nalaze izvan jezgre na lipidnim splavima u staničnoj membrani (Piskunov i Rochette-Egly 2012). Kod Erk signalnog puta dolazi do interakcije RAR proteina i PI3K ili Src kinaze ovisno o tipu stanice. Ova signalizacija dolazi i do jezgre gdje se aktivira iduća kinaza MSK1. U jezgri se fosforiliraju histoni – histon H3 na dva serina S10 i S28 – što potpomaže dekonenzaciji kromatina zbog privlačenja remodelirajućih proteinskih kompleksa na to mjesto. Osim histona fosforiliraju se i proteini povezani s transkripcijom ciljnih gena retinoične kiseline pa tako i RAR-ovi. Već je spomenuto da NTD regija sadrži konzervirana mjesta za fosforilaciju. To se odnosi na prolinom bogat motiv unutar kojeg se događa fosforilacija serina pomoću cdk7/ciklin H/MAT1 kompleksa koji je dio transkripcijskog faktora TFIID. Drugo mjesto za fosforilaciju nalazi se u LBD u omći između zavojnica H9 i H10 gdje je argininom i lizinom bogat motiv, a fosforilaciju serina obavlja MSK1 ili neka druga kinaza. Izrazito je bitan slijed fosforilacija RAR. Prvo MSK1 mora fosforilirati serin u LBD kako bi došlo do promjene strukture i interakcija između proteina što omogućuje vezanje ciklina H na LBD. Cdk7 se onda nađe u idealnoj poziciji za fosforilaciju serina u NTD (Slika 4) (Rochette-Egly 2015). Ova dva serina konzervirana su u svim poznatim receptorima retinoične kiseline sisavaca (Bastien i sur. 2000). U istraživanjima provedenim na stanicama pacijenata oboljelih od bolesti *Xeroderma Pigmentosum* s mutacijama u podjedinicama TFIID nije došlo do fosforilacije serina u NTD-u RAR $\alpha$  s negativnim posljedicama na ekspresiju ciljnih gena retinoične kiseline (Keriel i sur. 2002). Takvi rezultati upućuju na izrazitu važnost fosforilacije receptora retinoične kiseline u regulaciji genske ekspresije. Novija otkrića vezana za fosforilaciju serina u RAR-ovima donose zaključke da je fosforilacija neizostavna kako bi se RAR uopće mogao vezati za promotore ciljnih gena retinoične kiseline. U tom istraživanju pronađeno je da prvo p38MAPK aktivira kinazu MSK1 koja zatim pokreće daljnju kaskadu kinaza kao što je već opisano. Fosforilacija RAR $\alpha$  i histona H3 ovdje je ključna kako bi se ostvarila veza između RAR $\alpha$  i TFIID te kako bi se kromatin dekonenzirao i otkrio RARE sekvence. Kompleks RAR $\alpha$ /TFIID zatim će moći vezati RARE sekvence u genomu i potaknuti transkripciju ciljnih gena retinoične kiseline. Ovaj signalni put iznimno je bitan i kod razvoja tumora. Otkriveno je da stanice raka kod kojih se javljaju abnormalnosti u p38MAPK/MSK1 signalnom putu nemaju mogućnost ostvariti kaskadu kinaza potrebnu za ispravno funkcioniranje RAR $\alpha$  receptora. Zbog toga je odgovor stanice na retinoičnu kiselinu smanjen i transkripcijska aktivnost na ciljnim genima ne postoji. Takve tumorske stanice ne odgovaraju dobro na terapiju u kojoj se koristi retinoična kiselina jer se neće postići diferencijacija stanica

potaknuta RAR $\alpha$  aktivnošću. Takvo saznanje izrazito je bitno kod već postojeće terapije za akutnu promijelocitnu leukemiju unutar koje se koristi retinoična kiselina jer postoje pacijenti na koje takva terapija ne djeluje (Bruck i sur. 2009).

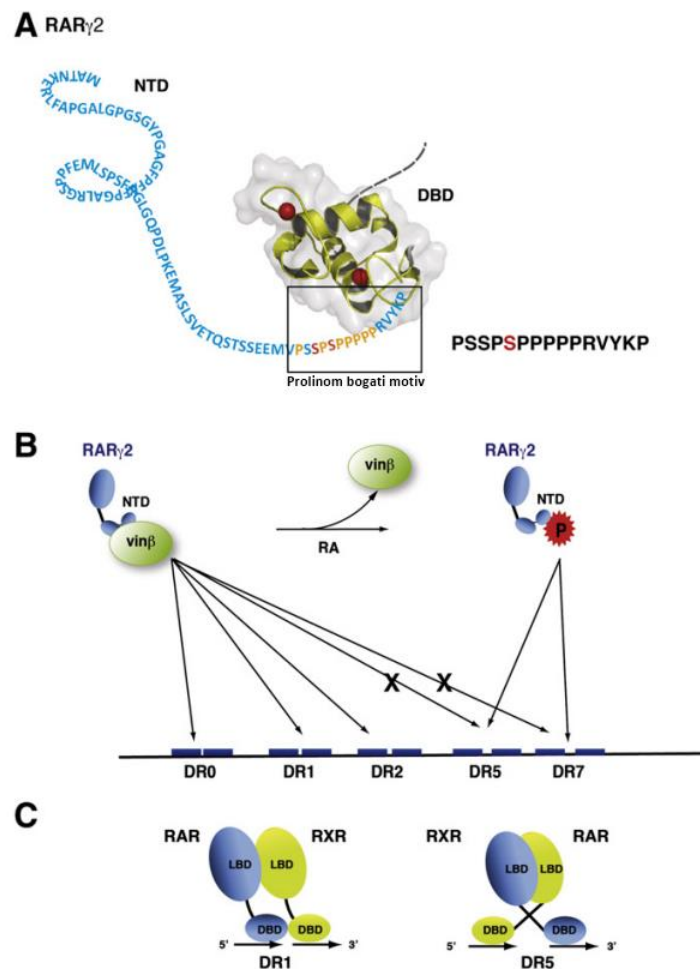


Slika 4 – Fosforilacija LBD regije receptora retinoične kiseline. (Preuzeto i prilagođeno iz Rochette-Egly, 2015)

### 2.1.1. Fosforilacija receptora retinoične kiseline u diferencijaciji matičnih stanica

Rochette-Egly i njen tim su 2014. i 2015. u svojim istraživanjima dali uvid u utjecaj fosforilacije RAR $\gamma$  na diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica miša. Kultura agregata matičnih stanica miša nakon tretmana retinoičnom kiselinom diferencira u mrežu neurona. U svom istraživanju koristili su matične stanice u kojima su geni za RAR zbog homologne rekombinacije bili poremećeni i u njima su eksprimirali RAR fosfomutante (Tanoury i sur. 2014). Matične stanice bez RAR $\gamma$  nisu se diferencirale u neurone, a od dvije RAR $\gamma$  izoforme nastale alternativnim prekrajanjem samo su stanice s RAR $\gamma$ 2 postale progenitorske stanice neurona. Mutanti koji su umjesto serina na poziciji 68 u NTD-u imali alanin također nisu postali neuroni. Proveli su i RNA sekvenciranje kako bi utvrdili na koje gene fosforilacija RAR $\gamma$ 2 ima utjecaj. Oko 50% gena kod kojih je pri normalnim okolnostima ekspresija povećana zbog utjecaja RAR $\gamma$ 2 nakon dodatka retinoične kiseline u fosfomutantima nije bilo aktivirano. Ti geni uključuju *Lefty-1*, *homeobox* gene *Gbx2*, *HNF1 $\beta$*  i *Meis2*, a svi sudjeluju u neuralnom razvoju. Pronašli su da fosforilirana forma RAR $\gamma$ 2 aktivira te gene vezanjem na RARE sekvencu kod koje su direktna ponavljanja heksamera odvojena s 5 ili 7 nukleotida, ali da nema interakcije s ostalim RARE

sekvencama. Prolinom bogati motiv u kojem se nalazi mjesto fosforilacije veže Src-homology-3 ili Trp-Trp domene, a novo je otkriven protein vineksin- $\beta$ -adaptor koji sadrži tri Src-homology-3 domene. Taj adaptor ostvaruje interakciju s nefosforiliranim oblikom RAR $\gamma$ 2 i inhibira ekspresiju gena jer skriva receptor od kromatina. Fosforilacijom NTD adaptor disocira s receptora i omogućuje DBD vezanje RARE sekvence čiji heksameri su udaljeniji (Slika 5) (Rochette-Egly, 2015).



Slika 5 – Vezanje RAR $\gamma$ 2 na specifične RARE sekvence pod utjecajem fosforilacije. **A.** Blizina DBD i mjesta fosforilacije u NTD. **B.** Utjecaj fosforilacije na tip RARE koji RAR $\gamma$ 2 veže. **C.** Vezanje heterodimera na RARE sekvence s razmaknicom od jednog nukleotida (DR1) i pet nukleotida (DR5). (Preuzeto i prilagođeno iz Rochette-Egly, 2015)

## 2.2. Djelovanje retinoične kiseline kroz druge signalne puteve

Retinoična kiselina do diferencijacije matičnih stanica može dovesti izravno, djelovanjem svojih receptora na epigenetičke promjene i ekspresiju gena koji dovode do opredjeljenja u određenu staničnu liniju (Gudas i Wagner 2011), ali još su zanimljiviji neizravni učinci ovog morfogena. Preko svojih receptora ili putem kaskade kinaza retinoična kiselina može potaknuti



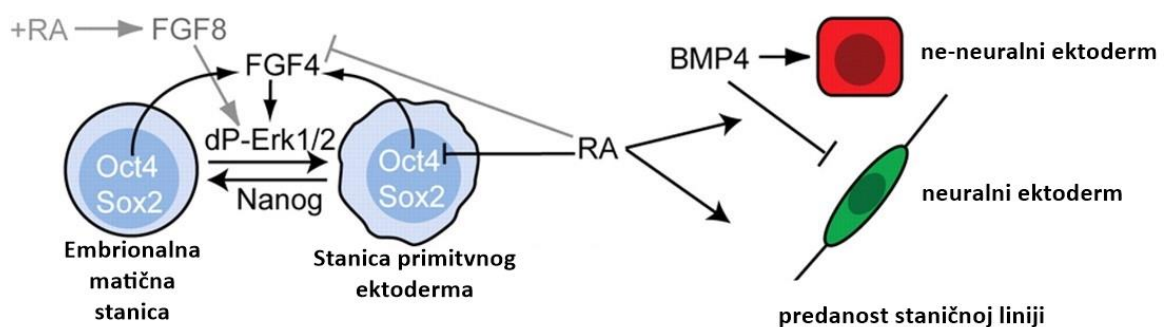
druge stanične signalne molekule na aktivaciju i tako dovesti do diferencijacije (Chen i sur. 2012). Retinoična kiselina služi kao općeniti pokretač diferencijacije i nije specifična za određenu staničnu liniju, ali koja stanična linija će se razviti ovisi o drugim aktivnim signalnim putevima (Stavridis i sur. 2010). U odlomcima koji slijede fokus će biti na liniji živčanih stanica i liniji germinativnih stanica. Spolne prastanice razvijaju se iz stanica epiblasta koje se nisu opredijelile u određeni zametni listić (McLaren 2003), a živčane stanice nastaju iz ektodermalnog listića (Abranches i sur. 2009) pa je već tu vidljiva sveobuhvatna uloga retinoične kiseline u diferencijaciji stanica sisavaca tijekom razvoja.

### **2.2.1. FGF signalni put u diferencijaciji matičnih stanica u neuralnu staničnu liniju**

Fibroblastni faktor rasta (*fibroblast growth factor*) zapravo je obitelj faktora rasta koja se sastoji od više od 20 članova. Oni svoje funkcije većinom obavljaju vezanjem na svoje receptore FGFr kao ligandi. Sudjeluju u diferencijaciji, proliferaciji i općenito preživljavanju stanica što ih čini ključnim proteinima za rast i razvoj sisavaca i mnogih drugih organizama (pronađeni su i u ribama, vodozemcima i pticama, a čak i u beskralješnjacima). Istaknutiji članovi FGF obitelji su FGF8 koji sudjeluje u neuralnom razvoju, FGF4 je ključan u proliferaciji matičnih stanica trofoblasta, a FGF1 i FGF2 djeluju tijekom angiogeneze (Yun i sur. 2010).

Stavridis i suradnici (2010) su dokazali da retinoična kiselina koristi FGF/Erk signalni put kako bi potaknula diferencijaciju. Koristili su hibridni protein GFP-Sox1 kako bi dokazali diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica u neuralne progenitorske stanice pošto je Sox1 ekspresija specifična za njih. Matične stanice su uzgajali u uvjetima sa i bez retinoida (retinoične kiseline) i utvrdili da će do diferencijacije doći samo u prisustvu retinoične kiseline. Htjeli su vidjeti je li potreban period FGF/Erk signalizacije kako bi došlo do diferencijacije ili je dovoljno tretirati matične stanice retinoičnom kiselinom pa su inkubirali stanice s inhibitorom FGF receptora te u tim stanicama nije bilo ekspresije Sox1, a gen pluripotentnosti *Nanog* je bio prisutan. FGF/Erk signalizacija očito je potrebna kako bi matične stanice izgubile sposobnost samoobnavljanja, tek tada će retinoična kiselina moći u njima uzrokovati diferencijaciju bez da se stanice vrate u pluripotentno stanje. Također su otkrili da je retinoična kiselina potrebna kako bi inicijalno povećala aktivnost signalnog puta FGF/Erk jer je došlo do represije signalnog puta kada su primijenili inhibitore RAR/RXR heterodimera. To je dovelo do zaključka da je za aktivaciju FGF/Erk signalizacije odgovorna genomska aktivnost retinoične kiseline, a ne njena sposobnost poticanja kaskade kinaza. Pratili su ekspresiju FGF4 i FGF8 te uvidjeli da retinoična kiselina potiče ekspresiju FGF8 čak i pri dodatku inhibitora FGFr, ali se Erk aktivnost utišava ako se FGF8 blokira protutijelom. To ukazuje da je FGF8 ključni protein posrednik za utjecaj

retinoične kiseline u aktivaciji Erk. Tijekom prvog dana inkubacije matičnih stanica s retinoičnom kiselinom došlo je dakle do povećanja aktivnosti FGF/Erk signalnog puta, ali tijekom drugog dana dolazi do utišavanja tog istog signalnog puta, a smatra se da je to posljedica smanjenja ekspresije FGF4 koji je glavni stimulator Erk signalizacije tijekom diferencijacije embrionalnih matičnih stanica. Tijekom prvog dana retinoična kiselina će uzrokovati smanjenje ekspresije gena pluripotentnosti *Oct4* i *Sox2*. Ekspresija oba gena potrebna za je ekspresiju FGF4, a pošto će retinoična kiselina na taj neizravan način djelovati na FGF4 potrebno joj je dulje vrijeme da utiša FGF4 pa će se smanjenje razine dogoditi tek drugi dan. Nakon smanjenja FGF/Erk akcije dolazi do ekspresije novih markera neuralnih progenitora: *Ngn2*, *Mash1* i *Pax6*. Osim ovog utjecaja na razvitak linije živčanih stanica, u svom su istraživanju dokazali da mehanizam kojim retinoična kiselina djeluje na FGF/Erk signalizaciju nije specifičan za tu staničnu liniju. Dodali su *Bmp4* – protein koji uzrokuje nastanak epitela, a inhibira nastanak neurona. Zajedničko prisustvo retinoične kiseline i *Bmp4* je povećalo ekspresiju gena markera epitela: keratin8 i keratin18 (Slika 6). U ovom istraživanju dokazana je općenita i konzervirana funkcija retinoične kiseline kao agensa diferencijacije koji u ovisnosti o prisustvu drugih indikatora staničnih linija uzrokuje diferencijaciju embrionalnih matičnih stanica i omogućuje rast i razvoj čitavog organizma.



Slika 6 – Diferencijacija embrionalnih matičnih stanica miša pod utjecajem retinoične kiseline s utjecajem na FGF/Erk signalni put. Retinoična kiselina povećava aktivnost FGF8 i potiče FGF/Erk signalizaciju što uzrokuje gubitak samoobnavljanja, a onda inhibira FGF4 ekspresiju. Prvo će nastati stanica primitivnog ektoderma kojoj je potrebna retinoična kiselina kako bi se predala u specifičnu staničnu liniju. (Preuzeto i prilagođeno iz Stavridis i sur. 2010)

### 2.2.2. Smad signalni put u diferencijaciji matičnih stanica u germinativnu staničnu liniju

Primordijalne germinativne stanice (PGC) nastaju iz epiblasta, prije diferencijacije zametnih listića. Mogu se pronaći u žumančanoj vreći odvojene od stanica namijenjenih za somatsku sudbinu. Migriraju iz izvanembrionalnog tkiva u embrionalno i to na mjesto razvitka gonada

gdje će se iz njih razviti muške ili ženske gamete i omogućiti reproduktivnu funkciju organizmu u kojem se razvijaju (McLaren 2003). U ženskim embrionalnim gonadama retinoična kiselina proizvedena u mezonefrosu poslužit će kao poticaj za mejozu, a u muškim embrionalnim gonadama aktivan je citokrom P 26 koji će uzrokovati degradaciju retinoične kiseline pa do mejoze neće doći u tom stadiju. Iako mejoza počinje u različito vrijeme, retinoična kiselina će u obje vrste gameta potaknuti mejozu povećanjem ekspresije *Stra8* (Koubova i sur. 2005). BMP (*Bone morphogenic protein*) je signalna molekula koja se izlučuje iz izvanembrionalnog ektoderma i potiče aktivaciju Smad1/5 unutarstaničnog signalnog puta u primordijalnim germinativnim stanicama koji se smatra ključnim za njihovu proliferaciju (Ying i Zhao 2001). Smad1 i Smad5 spadaju u R razred Smad unutarstaničnih medijatora i regulirani su receptorskim kinazama, a zajedno sa Smad8 posreduju signalizaciju BMP receptora. Djeluju kao transkripcijski faktori i nakon aktivacije ulaze u jezgru gdje reguliraju ekspresiju gena (Wrana i Attisano 2000).

Chen i suradnici (2012) željeli su saznati na koji način retinoična kiselina ostvaruje regulaciju *Stra8* gena pa su na promotor gena ugradili GFP kako bi nastao hibridni protein GFP-Stra8. Očekivano su nakon tretmana embrionalnih matičnih stanica miša retinoičnom kiselinom dobili GFP-Stra8 pozitivne stanice i potvrdili da retinoična kiselina zaista djeluje na ekspresiju *Stra8* u matičnim stanicama, a njegovo nakupljanje počinje već sat vremena nakon dodatka kiseline. Razina markera mejoze (*Dazl*) i markera diferencirajućih PGC (*Mvh*) također su narasle nakon tretmana s retinoičnom kiselinom što znači da ona u početnim stadijima diferencijacije germinativne stanične linije potiče ekspresiju gena germinativnih stanica. Pošto je uz diferencijaciju detektirana i povećana razina *BMP2* i *BMP8b* mRNA može se pretpostaviti da Smad proteini sudjeluju u diferencijaciji germinativne stanične linije kao transkripcijski faktori. I zaista su u istraživanju detektirali aktivaciju Smad1/5 puta već dva sata nakon tretmana retinoičnom kiselinom. Primijenili su i spoj SB431542 koji povećava aktivnost Smad1/5 u embrionalnim matičnim stanicama i kada su na te stanice dodali retinoičnu kiselinu došlo je do velikog povećanja ekspresije gena germinativne stanične linije u usporedbi sa stanicama koje su bile tretirane samo retinoičnom kiselinom. Na kraju su još koristili RNAi mehanizam kako bi dobili *knock-out* gena *Smad1*, *Smad5* ili oba gena. Kod stanica koje su imale oba gena izvan funkcije dosta se smanjila ekspresija gena germinativnih stanica nakon tretmana s retinoičnom kiselinom u usporedbi s normalnim stanicama.

U tom radu fokus je bio na Smad1 i Smad5 kao pripadnicima BMP signalne kaskade, ali ne izostavlja se mogućnost da bi retinoična kiselina mogla djelovati i na druge sudionike. Svakako

se može zaključiti da je Smad signalizacija ključna u reprogramiranju matične stanice u germinativnu staničnu liniju i da retinoična kiselina i ovdje služi kao onaj glavni poticaj u preokretu stanice iz samoobnavljajućeg u diferencirano stanje.

### **2.3. Utjecaj retinoične kiseline na mikroRNA ekspresiju u diferencijaciji matičnih stanica**

MikroRNA su male regulatorne RNA molekule. One nastaju transkripcijom iz genoma pomoću RNA polimeraze II. Zbog prisutnosti autokomplementarnosti prvo stvaraju dvolančane dijelove, a nakon obrade enzimima Drosha i Dicer nastaje jednolančana RNA koja u sklopu ribonukleoproteinskog kompleksa sudjeluje u regulaciji ekspresije gena. Taj ribonukleoproteinski kompleks naziva se RISC (*RNA induced silencing complex*), a najvažnija proteinska komponenta je enzim Argonaut koji može vezati RNA, ali i služiti kao RNaza i cijepati RNA. Sadrži aktivno mjesto s magnezijevim ionima unutar kojeg se odvija cijepanje komplementarne mRNA. MikroRNA će većinom uzrokovati smanjenje ekspresije određenog gena, bilo sprečavanjem translacije ili uzrokovanjem degradacije mRNA, a postoje i drugi mehanizmi kojima se smanjuje količina određene mRNA u stanici. Smatra se da je za djelovanje mikroRNA najvažnija sekvenca na 5'-UTR od drugog do osmog nukleotida – ako je ona komplementarna s ciljanom mRNA dogodit će se degradacija. Ukoliko je mikroRNA slabo uparena s nekom mRNA prvenstveno će se dogoditi represija translacije zbog nemogućnosti vezanja ribosoma. Kod savršene komplementarnosti mRNA s mikroRNA uglavnom dolazi do razgradnje te mRNA pomoću RISC kompleksa. Regulacija ekspresije samih mikroRNA događa se preko transkripcijske aktivacije ili inhibicije, a može biti postignuta i preko epigenetičkih modifikacija (Mohr i Mott, 2015). Osim što su važne u svakodnevnoj genskoj ekspresiji, mikroRNA su izrazito bitne u embrionalnom razvoju i omogućuju nastanak diferenciranih stanica iz embrionalnih matičnih stanica finom regulacijom ekspresije gena. Djelovanjem na mRNA gena pluripotencije kao što su *Nanog*, *Oct4* i *Sox2* dolazi do diferencijacije matičnih stanica miša (Tay i sur. 2008).

Značajno je otkriće da retinoična kiselina utječe na ekspresiju mikroRNA kako bi došlo do diferencijacije matičnih stanica. Zhang i suradnici (2015) su proveli istraživanje s ciljem saznanja kako retinoična kiselina regulira mikroRNA ekspresiju u diferencirajućim matičnim stanicama. Sekvenciranjem malih RNA u mišjim embrionalnim stanicama usporedili su ekspresiju u stanicama koje su tretirane retinoičnom kiselinom i stanicama koje nisu došle u dodir s njome. Pronašli su čak 175 mikroRNA koje imaju drastično smanjenu ekspresiju i još

31 s povećanjem ekspresije. Smanjenu ekspresiju su između ostalih imale mikroRNA iz porodice miR-200 koje su vrlo važne u determinaciji epitela. Već je prije spomenuta važna uloga retinoične kiseline u diferencijaciji matičnih stanica u epitelnu staničnu liniju (Stavridis i sur. 2010) pa su se u daljnjem istraživanju fokusirali na mikroRNA koje determiniraju fenotip epitela. Od triju miR-200 mikroRNA prekomjernom ekspresijom su dokazali da miR-200b i c uzrokuju povećanje u ekspresiji gena pluripotentnosti *Nanog* i *Oct4*, dok miR-200a nije imala nikakav utjecaj na te gene. Kada su u stanice ubacili inhibitore miR-200b i c primijetili su pad u ekspresiji *Nanog* i *Oct4* što upućuje na zaključak da retinoična kiselina inhibira te dvije mikroRNA i potiče smanjenje ekspresije gena pluripotentnosti. Također je primijećeno da je inhibicija miR-200b i c rezultirala i povećanjem ekspresije gena *Nestin* koji služi kao gen marker ektodermalne stanične linije.

### **3. Primjena retinoične kiseline u terapijske svrhe**

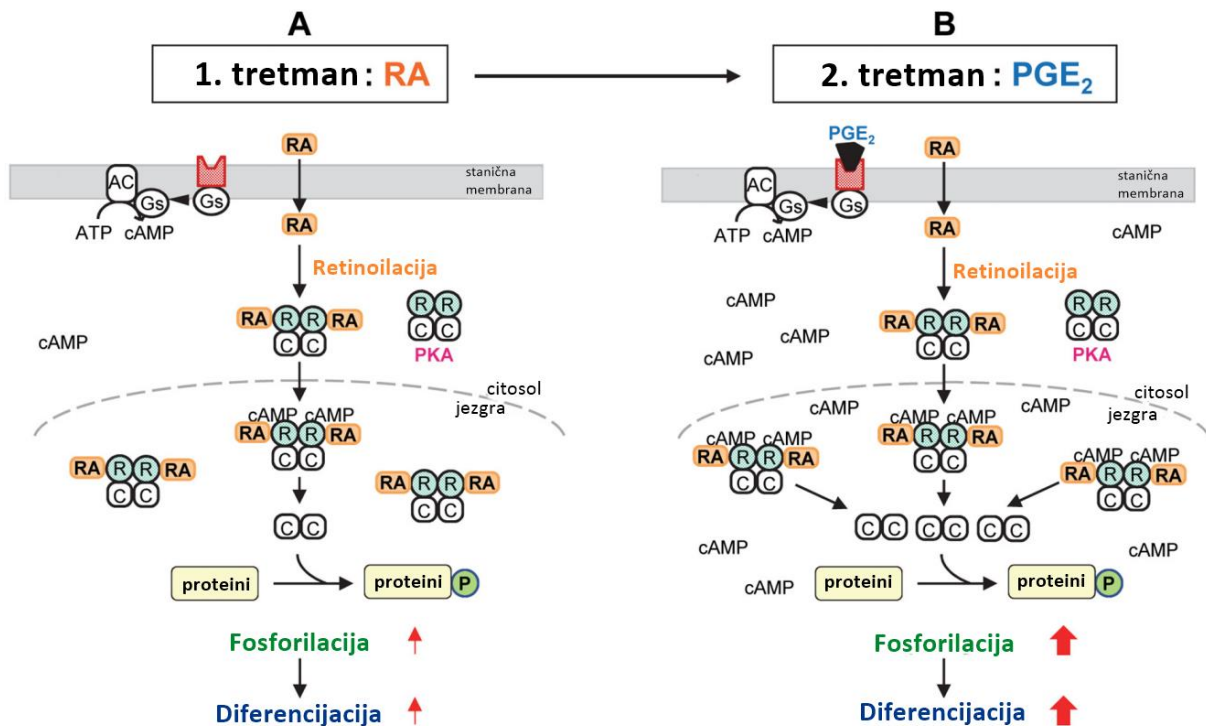
Sposobnost retinoične kiseline da uzrokuje diferencijaciju vrlo je primamljivo svojstvo u borbi protiv raznih bolesti. Tu se prvenstveno misli na razne maligne tumore i leukemije kod kojih se stanice nekontrolirano dijele zbog manjka diferencijacije. Kod takvih bolesti vrlo je teško uspostaviti povoljnu terapiju i retinoična kiselina otvara vrata svijetloj budućnosti borbe protiv raka, ali potreba za velikim oprezom je prisutna zbog različitog učinka retinoične kiseline na različite stanične linije jer osim diferencijacije može potaknuti i proliferaciju (Mezquita i Mezquita 2019).

#### **3.1. Utjecaj retinoilacije na diferencijaciju stanica akutne promijelocitne leukemije**

Opće je poznato da masne kiseline mogu služiti za modifikaciju proteina. Acetilacija i miristilacija česti su načini modifikacije, a važni su za lokalizaciju proteina unutar stanice i transdukciju signala. Retinoična kiselina prvenstveno je aktivna fiziološka molekula, ali u njejoj strukturi nalazi se karboksilna skupina pa retinoična kiselina sadrži hidrofobni i hidrofilni dio pa bi se mogla svrstati i u masne kiseline i uzrokovati modifikacije proteina. Retinoilacija upravo predstavlja reakciju modifikacije prenošenjem retinoilne skupine na neku aminokiselinu preko intermedijera s koenzimom-A (Takahashi i sur. 2022). Retinoilaciju su istraživali na stanicama HL60, što se odnosi na staničnu liniju akutne promijelocitne leukemije, te su gledali utjecaj retinoične kiseline na njihovu diferencijaciju i prestanak proliferacije. Dokaz retinoilacije proteina *in vitro* dobiven je preko radioaktivno označene retinoične kiseline s tricijem. Nakon što je sva slobodna retinoična kiselina ekstrahirana iz stanica i dalje se mogla

detektirati radioaktivnost u stanicama. Nakon digestije proteina pomoću enzima proteinaze K ponovno je nastala slobodna retinoična kiselina i radioaktivnost je detektirana u otopini. To je upućivalo na zaključak da su unutarstanični proteini modificirani retinoičnom kiselinom, a pomoću metanol-kalijevog hidroksida uspjeli su detektirati da retinoilacija vjerojatno uključuje nastanak tioesterske veze, a intermedijer je retinoil-CoA, no također su pronađene i amidne i esterske veze. Istraživanja su zatim nastavljena *in vivo* na štakorima s deficijencijom vitamina A kojima je retinoična kiselina injektirana intraperitonealno. Najviše retinoilacije detektirali su u bubrezima i jetri (Takahashi i Breitman 1991). Otkriveno je da reakcija retinoilacije ima dva koraka, u prvom će nastati intermedijer retinoil-CoA, a u drugom koraku nastaju retinoilirani protein. Lokalizacija te reakcije najjača je u endoplazmatskom retikulumu pa se smatra da se tamo nalazi najviše enzima koji ju potiču. Također je značajno da će retinoilirani protein nastati samo u prisustvu mikrosoma, ATP-a, CoA i MgCl<sub>2</sub>. Retinoilirani proteini nalaze se unutar jezgre i pokazuju povećan afinitet vezanja DNA. Retinoilacija je posttranslacijska modifikacija i događa se na već postojećim proteinima. U HL60 stanicama, kao glavni retinoilirani protein otkriven je vimentin – filamentni protein intermedijer. Retinoična kiselina je povezana s vimentinom preko kovalentne veze, ali smatra se da to nije tioesterska veza, već esterska. Protein je lokaliziran u jezgri, a najveća mu je koncentracija u jezgrinoj ovojnici (Takahashi i Breitman 1994). Kada su promatrali diferencijaciju HL60 stanica primijetili su da se događa retinoilacija otprilike 20 proteina, a jedan od njih je i cAMP-ovisna proteinska kinaza A, točnije njezina regulatorna jedinica (PKA-R). Također su retinoilirani proteini uključeni u citoskeletne promjene tijekom diferencijacije:  $\alpha$ -aktinin i Rho-GDI $\beta$ . U ranim stadijima diferencijacije izražena je retinoilacija proteinskih kinaza, a pretpostavlja se da je vimentin bitan u kasnijim fazama diferencijacije jer mu tada raste količina retinoilacije. U terapijske svrhe najbolja kombinacija tretmana su retinoična kiselina i induktor proizvodnje cAMP-a: PGE2 (Slika 7). Vrlo je važan slijed tih tretmana kako bi se dogodio sinergistički učinak i ubrzala diferencijacija stanica. Tretman samo sa retinoičnom kiselinom uzrokuje stabilnost PKA i njenu translokaciju iz citoplazme u jezgru. PKA će u jezgri fosforilirati proteine što će dovesti do diferencijacije stanice. Ako se doda samo PGE2 on će se vezati za receptor EP2 na staničnoj membrani i aktivirati adenilat ciklazu koja će stvarati cAMP i doći će do jače fosforilacije proteina u citoplazmi pomoću PKA, ali neće se dogoditi diferencijacija stanice. Ako se ta dva tretmana kombiniraju, prvo tretman retinoičnom kiselinom, a zatim tretman s PGE2 doći će do velikog povećanja intenziteta diferencijacije stanice. Smatra se da retinoilacija služi kao lokalizacijski signal za jezgru na PKA što uzrokuje njihovu translokaciju, a također sprečava razgradnju regulatorne podjedinice PKA jer smanjuje njenu ubikvitinaciju. Povećanje fosforilacijske

aktivnosti PKA uzrokuje porast razine cAMP u stanici. Zajedno će retinoična kiselina i cAMP dovesti do diferencijacije HL60 stanica u granulocitne stanice – umjesto stanica nalik matičnim stanicama koje nekontrolirano proliferiraju nastat će diferencirani leukociti koji se normalno nalaze u organizmu. Retinoična kiselina dakle ima veliki potencijal u liječenju bolesti koje se vrlo teško liječe i uzrokuju velike probleme kod bolesnika. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se detaljno otkrili mehanizmi djelovanja te molekule kako bi se mogla sigurno koristiti u liječenju ostalih bolesti osim akutne promijelocitne leukemije.



Slika 7 – Sinergistički utjecaj tretmana retinoičnom kiselinom i s PGE2 na diferencijaciju stanica akutne promijelocitne leukemije. (Preuzeto i prilagođeno iz N. Takahashi i sur. 2022)

### 3.2. Dvojaka funkcija retinoične kiseline

Posljedice djelovanja retinoične kiseline mogu biti u smjeru diferencijacije kako je objašnjeno i prije u ovom radu, ali, ovisno o tipu stanice na koju djeluje, retinoična kiselina može uzrokovati i proliferaciju. Točnije, može se potaknuti tzv. matičnost stanica koje se onda nalaze u nediferenciranom stanju i imaju veliku sposobnost diobe (Mezquita i Mezquita 2019). Istraživanja na stanicama raka dojke dala su dobre uvide u ovu problematiku. Mliječne žlijezde su tkivo koje se razvija tek postnatalno i stoga je iznimno važna dobra kontrola ravnoteže između samoobavljanja i diferencijacije stanica. Tumorske stanice kod raka dojke poprimaju fenotip progenitora ili matičnih stanica, a gube osobine diferenciranih stanica. U njima se javljaju epigenetičke modifikacije na histonima koje služe kao inhibitori ekspresije tumor-

supresorskih gena koji bi se inače eksprimirali kao odgovor stanice na djelovanje retinoične kiseline. Stoga je izrazito važna ravnoteža između transkripcijskih i netranskripcijskih tj. genomskih i negenomskih funkcija retinoične kiseline. Negenomske uloge često mogu poticati razvoj tumora pa tu spada PI3K-AKT signalni put u kojem dolazi i do izravnog kontakta s RAR $\alpha$  receptorom, a uzrokuje proliferaciju tumora dojke (Rossetti i sur. 2016). Važna je i diferencijalna genska ekspresija u različitim staničnim linijama, najčešće uzrokovana različitim uzorkom metilacije na DNA. U nekim stanicama retinoična kiselina će zbog međudjelovanja s produktima genske ekspresije uzrokovati supresiju rasta tumora, dok će u drugima povećati tumorogeničnost stanice i uzrokovati proliferaciju. Kod neinvazivnih vrsta raka i u netumorskim stanicama mliječnih žlijezda retinoična kiselina djelovat će pozitivno i potaknuti aktivaciju gena za diferencijaciju stanice, a također uzrokuje pojavu malih nekodirajućih RNA koje ciljano smanjuju količinu proteina koji sudjeluju u održavanju pluripotentnosti stanice. Kod agresivnih tipova tumora dojke retinoična kiselina ne može potaknuti diferencijaciju (Marcato i sur. 2015). Dosta je važna ekspresija RAR $\beta$  receptora, a ovisno o tipu tumora on će potaknuti proliferaciju ili diferencijaciju. Kod neagresivnih vrsta raka dojke retinoična kiselina povećava lokalizaciju RAR $\beta$  receptora i TET2 (metilcitozin dioksigenaza) unutar jezgre. TET2 katalizira prijelaz 5-metilcitozina, koji služi kao represivni marker kromatina i sprečava ekspresiju gena, u 5-hidroksimetilcitozin, koji uzrokuje aktivaciju ekspresije. Kao posljedica toga aktiviraju se geni tumor-supresora i sprečava se proliferacija tumora, a potiče diferencijacija. Kod agresivnih tumora će TET2 zaostati u citoplazmi jer nema dovoljno RAR $\beta$  pa tretman s retinoičnom kiselinom ne uzrokuje diferencijaciju. Još se jedna opasnost javlja kod RAR $\beta$ . Ukoliko se on nađe u stromi tumora dogodit će se proliferacija raka dojke, a smatra se da se to vjerojatno događa stvaranjem kemokina SDF-1 u stanicama strome, a zatim se aktivira signalni put Src-ErbB2-Akt koji će potaknuti staničnu proliferaciju (Liu i sur. 2011).

Osim u tkivu mliječnih žlijezda, retinoična kiselina izaziva oprečne odgovore u mnogim drugim tkivima u organizmu. Kratkotrajni tretman induciranih pluripotentnih matičnih stanica retinoičnom kiselinom uzrokovat će održavanje pluripotentnosti, za razliku od embrionalnih matičnih stanica o kojima je bila riječ u ovom radu (De Angelis i sur. 2018). U razvoju živčanog sustava retinoična kiselina uglavnom će poticati diferencijaciju, ali postoje slučajevi kada je retinoična kiselina potrebna za proliferaciju. Kod rane neurogeneze bitna je za proliferaciju moždane kore, točnije za proliferaciju radijalnih glija stanica koje će omogućiti pravovremen nastanak neurona u dovoljnim količinama pa nedostatak retinoične kiseline može uzrokovati mikrocefaliju (Mishra i sur. 2018). Retinoična kiselina ključna je i u krvotvornom sustavu gdje



je neophodna za nastanak zrelih krvnih stanica iz njihovih progenitora procesom hematopoeze (Purton i sur. 2006). Retinoična kiselina pokazuje pozitivne učinke kod raka debelog crijeva gdje inhibira proliferaciju tumora i njegovo metastaziranje (Guo i sur. 2016). U spolnom sustavu retinoična kiselina sprečava razvoj tumora jajnika (Young i sur. 2014). Također, je bitna tijekom spermatogeneze gdje će inducirati ekspresiju *Stra8* gena koji potiče diferencijaciju spermatogonija i inducira mejozu, a retinoična kiselina sudjeluje i u elongaciji spermatida i oslobađanju spermija (Wang i sur. 2016).

Retinoična kiselina sve se više pokazuje kao idealan alat za korištenje prilikom liječenja malignih bolesti, ali može biti i vrlo opasna ukoliko se ne znaju svi signalni putevi prisutni u nekom mikrookolišu jer to može odvagnuti djelovanje retinoične kiseline prema diferencijaciji ili proliferaciji.

#### **4. Zaključak**

Na kraju ovog seminarskog rada može se zaključiti da je retinoična kiselina izrazito bitan faktor u diferencijaciji matičnih stanica. Bez nje diferencijacija ne bi bila moguća. Analizom mnogih istraživačkih radova vidljivo je da retinoična kiselina u diferencijaciji sudjeluje na genomskoj razini transkripcijskom aktivacijom i supresijom putem svojih receptora, ali postoje i ključne akcije retinoične kiseline izvan genoma. Može aktivirati razne signalne puteve, kao što su kaskade kinaza, ili biti stimulans u signalnim mehanizmima drugih molekula. Također je poznato i njeno djelovanje na modifikaciju proteina putem retinoilacije. Retinoična kiselina neće potaknuti razvoj samo jedne stanične linije, već u suradnji s drugim molekulama u staničnom mikrookolišu omogućuje diferencijaciju i razvoj stanica svih zametnih listića.

Međutim, retinoična se kiselina može ponašati i kao inicijator proliferacije, a ne diferencijacije. Njen dvojak utjecaj još uvijek je nedovoljno proučen te su potrebna još mnoga istraživanja za potpuno razumijevanje kako retinoična kiselina potiče diferencijaciju ili proliferaciju i koje su ostale molekule i signalni putevi odgovorni za staničnu sudbinu koju će retinoična kiselina uzrokovati.

Retinoična kiselina zbog svoje sposobnosti da potakne diferencijaciju ima velik potencijal u terapijama protiv malignih bolesti. Može spriječiti proliferaciju stanica raka tako što će od stanica sličnih matičnim stanicama koje se nekontrolirano dijele potaknuti razvoj diferenciranih stanica. No potreban je veliki oprez pri primjeni retinoične kiseline u obliku lijeka jer može potaknuti i suprotan učinak i time pogoršati rak.

Retinoična kiselina je molekula s raznolikim funkcijama, a većina njenih učinaka još nije u potpunosti poznata. Kako bi se njena uloga u diferencijaciji matičnih stanica do kraja razjasnila potrebno je poticati daljnja istraživanja pomoću kojih treba doći do otkrića svih komponenti koje utječu na njeno djelovanje. Ostvarivanje potencijala retinoične kiseline predstavlja budućnost biomedicinskih uspjeha i napredak u liječenju teških bolesti.

## 5. LITERATURA

- Abranches, E., Silva, M., Pradier, L., Schulz, H., Hummel, O., Henrique, D., Bekman, E. (2009). Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: A road map to neurogenesis in the embryo. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006286>
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P., Rochette-Egly, C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor  $\gamma$  and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21896–21904. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001985200>
- Breitman, T. R., Selonick, S. E., Collins, S. J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid\* (retinoids/myeloid differentiation/hematopoiesis). *Medical Sciences*, 77(5), 2936–2940. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2936>
- Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., De Thé, H., Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR $\alpha$  to target promoters. *EMBO Journal*, 28(1), 34–47. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.256>
- Chen, W., Jia, W., Wang, K., Zhou, Q., Leng, Y., Duan, T., Kang, J. (2012). Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(3), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.078>
- de Angelis, M. T., Parrotta, E. I., Santamaria, G., Cuda, G. (2018). Short-term retinoic acid treatment sustains pluripotency and suppresses differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death and Disease*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0028-1>
- de Lera, A. R., Bourguet, W., Altucci, L., Gronemeyer, H. (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(10), 811–820. <https://doi.org/10.1038/nrd2398>
- Foster, C. S., Dodson, A., Karavana, V., Smith, P. H., Ke, Y. (2002). An introduction to stem cells. *Journal of Pathology*, 197(4), 419–423. <https://doi.org/10.1002/path.1187>
- Gillespie, R. F., Gudas, L. J. (2007). Retinoid Regulated Association of Transcriptional Coregulators and the Polycomb Group Protein SUZ12 with the Retinoic Acid Response Elements of Hoxa1, RAR $\beta$ 2, and Cyp26A1 in F9 Embryonal Carcinoma Cells. *Journal of Molecular Biology*, 372(2), 298–316. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.079>
- Gudas, L. J., & Wagner, J. A. (2011). Retinoids regulate stem cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 322–330. <https://doi.org/10.1002/jcp.22417>
- Guo, P. Da, Lu, X. X., Gan, W. J., Li, X. M., He, X. S., Zhang, S., Ji, Q. H., Zhou, F., Cao, Y., Wang, J. R., Li, J. M., Wu, H. (2016). RAR $\gamma$  downregulation contributes to colorectal tumorigenesis and metastasis by derepressing the hippo-yap pathway. *Cancer Research*, 76(13), 3813–3825. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2882>
- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Cile Rochette-Egly, C., Egly, J.-M. (2002). XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RAR $\alpha$ . *Cell*, 109, 125–135. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00692-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00692-x)

- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., Page, D. C. (2005). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2474-2479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103>
- Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E. D., Thomson, J., Wilmut, I. (2009). *Essentials of stem cell biology* (2. izd.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-00078-6>
- Lee, L. M. Y., Leung, C. Y., Tang, W. W. C., Choi, H. L., Leung, Y. C., McCaffery, P. J., Wang, C. C., Woolf, A. S., Shum, A. S. W. (2012). A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13668–13673. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200872109>
- Liu, X., Nugoli, M., Laferrière, J., Saleh, S. M., Rodrigue-Gervais, I. G., Saleh, M., Park, M., Hallett, M. T., Muller, W. J., Giguère, V. (2011). Stromal retinoic acid receptor  $\beta$  promotes mammary gland tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(2), 774–779. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011845108>
- Marcato, P., Dean, C. A., Liu, R. Z., Coyle, K. M., Bydoun, M., Wallace, M., Clements, D., Turner, C., Mathenge, E. G., Gujar, S. A., Giacomantonio, C. A., Mackey, J. R., Godbout, R., Lee, P. W. K. (2015). Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. *Molecular Oncology*, 9(1), 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.010>
- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*, 262(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00214-8)
- Mezquita, B., Mezquita, C. (2019). Two opposing faces of retinoic acid: Induction of stemness or induction of differentiation depending on cell-type. *Biomolecules*, 9(10), 567–584. <https://doi.org/10.3390/biom9100567>
- Mishra, S., Kelly, K. K., Rumian, N. L., Siegenthaler, J. A. (2018). Retinoic Acid Is Required for Neural Stem and Progenitor Cell Proliferation in the Adult Hippocampus. *Stem Cell Reports*, 10(6), 1705–1720. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.04.024>
- Mohr, A. M., Mott, J. L. (2015). Overview of mikroRNA biology. *Seminars in Liver Disease*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>
- Moutier, E., Ye, T., Choukrallah, M. A., Urban, S., Osz, J., Chatagnon, A., Delacroix, L., Langer, D., Rochel, N., Moras, D., Benoit, G., Davidson, I. (2012). Retinoic acid receptors recognize the mouse genome through binding elements with diverse spacing and topology. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26328–26341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361790>
- Niederreither, K., Dollé, P. (2008). Retinoic acid in development: Towards an integrated view. *Nature Reviews Genetics*, 9(7), 541–553. <https://doi.org/10.1038/nrg2340>
- Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. (2010). Deconstructing repression: Evolving models of co-repressor action. *Nature Reviews Genetics*, 11(2), 109–123. <https://doi.org/10.1038/nrg2736>
- Piskunov, A., Rochette-Egly, C. (2012). A retinoic acid receptor RAR $\alpha$  pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein  $\alpha$ Q to activate p38MAPK. *Oncogene*, 31(28), 3333–3345. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.499>

- Purton, L. E., Dworkin, S., Olsen, G. H., Walkley, C. R., Fabb, S. A., Collins, S. J., Chambon, P. (2006). RAR $\gamma$  is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 203(5), 1283–1293. <https://doi.org/10.1084/jem.20052105>
- Rochette-Egly, C. (2015). Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.04.003>
- Rossetti, S., Ren, M., Visconti, N., Corlazzoli, F., Gagliostro, V., Somenzi, G., Yao, J., Sun, Y., Sacchi, N. (2016). Tracing anti-cancer and cancer-promoting actions of all-trans retinoic acid in breast cancer to a RAR $\alpha$  epigenetic mechanism of mammary epithelial cell fate. *Oncotarget*, 7(52), 87064–87080. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13500>
- Stavridis, M. P., Collins, B. J., Storey, K. G. (2010). Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation. *Development*, 137(6), 881–890. <https://doi.org/10.1242/dev.043117>
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, N., Breitman, T. R. (1991). Retinoylation of Proteins in Leukemia, Embryonal Carcinoma, and Normal Kidney Cell Lines: Differences Associated with Differential Responses to Retinoic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285(1), 105–110. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90334-F](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90334-F)
- Takahashi, N., Saito, D., Hasegawa, S., Yamasaki, M., Imai, M. (2022). Vitamin A in health care: Suppression of growth and induction of differentiation in cancer cells by vitamin A and its derivatives and their mechanisms of action. *Pharmacology and Therapeutics*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107942>
- Takahashi, N., Breitman, T. R. (1994). Retinoylation of Vimentin in the Human Myeloid Leukemia Cell Line HL60. *Journal of Biological Chemistry*, 269(8), 5913–5917. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37548-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37548-8)
- Tanoury, Z. Al, Gaouar, S., Piskunov, A., Ye, T., Urban, S., Jost, B., Keime, C., Davidson, I., Dierich, A., Rochette-Egly, C. (2014). Phosphorylation of the retinoic acid receptor RAR $\gamma$ 2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 127(9), 2095–2105. <https://doi.org/10.1242/jcs.145979>
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A. M., Lim, B., Rigoutsos, I. (2008). MikroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 455(7216), 1124–1128. <https://doi.org/10.1038/nature07299>
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 105(2), 140–156. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21096>
- Wang, S., Wang, X., Ma, L., Lin, X., Zhang, D., Li, Z., Wu, Y., Zheng, C., Feng, X., Liao, S., Feng, Y., Chen, J., Hu, X., Wang, M., Han, C. (2016). Retinoic Acid Is Sufficient for the In Vitro Induction of Mouse Spermatocytes. *Stem Cell Reports*, 7(1), 80–94. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.013>

- Wrana, J. L., Attisano, L. (2000). The Smad pathway. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11(1–2), 5–13. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(99\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(99)00024-6)
- Ying, Y., Zhao, G. Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Developmental Biology*, 232(2), 484–492. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0173>
- Young, M. J., Wu, Y. H., Chiu, W. T., Weng, T. Y., Huang, Y. F., Chou, C. Y. (2014). All-trans retinoic acid downregulates ALDH1-mediated stemness and inhibits tumour formation in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 36(4), 498–507. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv018>
- Yun, Y. R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J. H., Shin, U. S., Kim, H. W. (2010). Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. *Journal of Tissue Engineering*, 1(1), 1–18. <https://doi.org/10.4061/2010/218142>
- Zhang, J., Gao, Y., Yu, M., Wu, H., Ai, Z., Wu, Y., Liu, H., Du, J., Guo, Z., Zhang, Y. (2015). Retinoic acid induces embryonic stem cell differentiation by altering both encoding RNA and mikroRNA expression. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132566>

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 2002. godine u Zagrebu, gdje sam i pohađala Osnovnu školu Retkovec te u sklopu srednjoškolskog obrazovanja Gimnaziju Sesvete, u kojoj sam maturirala 2021. godine. Zatim upisujem prijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dodatno praktično iskustvo u području kliničke embriologije stekla sam 2024. godine u sklopu studentske prakse u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice u Zagrebu. Tečno govorim engleski jezik, a iz njemačkog jezika posjedujem i jezičnu diplomu na razini C1.