Kloniranje liganda JAGGED1 i njegov utjecaj na proliferaciju limfocita

Šetinc, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:395678

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Maja Šetinc

KLONIRANJE LIGANDA *JAGGED1* I NJEGOV UTJECAJ NA PROLIFERACIJU LIMFOCITA

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Luke Horvata. Rad je izrađen u okviru projekta HRZZ "Notch in hematopoietic stem cell differentiation and leukemia development" (voditelj dr. sc. M. Antica, IP-2013-11-7140). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Željela bih se zahvaliti svojoj mentorici, profesorici Maji Matulić, na svemu što me naučila, na svom vremenu odvojenom za odgovaranje na moja pitanja, te na svim vrijednim savjetima koje mi dala.

Velika hvala Luki, za sve sate koje smo zajedno proveli u laboratoriju, za nevjerojatno strpljenje i optimizam koji ne posustaje čak ni kada stvari ne idu onako kako smo planirali. :)

Hvala mojim roditeljima i baki, na svoj brizi i podršci koju mi uvijek pružaju.

I na kraju, željela bih se zahvaliti Dori, svojoj kolegici i najboljoj prijateljici, što je uvijek tu za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

KLONIRANJE LIGANDA *JAGGED1* I NJEGOV UTJECAJ NA PROLIFERACIJU LIMFOCITA

Maja Šetinc
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Signalni put Notch igra ključnu ulogu u određivanju stanične sudbine u brojnim tkivima. Ovisno o vrsti stanica, aktivacija puta Notch može rezultirati diferencijacijom, proliferacijom ili apoptozom. Receptori Notch transmembranski su proteini s velikom ekstracelularnom domenom koja veže ligande, transmembranske proteine na susjednoj stanici. Prilikom vezanja liganda i receptora intracelularna domena receptora se proteolitički cijepa i putuje u jezgru, gdje se veže s transkripcijskim faktorom CSL i tako regulira transkripciju gena. Ligandi receptora Notch dijele se u dvije skupine – ligande "Delta-like" (DLL) i ligande Jagged. Signalni put Notch ima važnu ulogu u diferencijaciji krvnih stanica, a pogreške u regulaciji tog procesa mogu dovesti do transformacije stanica i nastanka leukemija. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati utjecaj liganda JAGGED1 na proliferaciju limfocita i aktivaciju puta Notch. Konstruiran je ekspresijski plazmid sa sekvencijom liganda *JAGGED1*. Leukemijski B-limfociti uzgajani su u kokulturi s adherentnim stanicama koje eksprimiraju ovaj ligand. Pratila se proliferacija limfocita u kokulturi u odnosu na kulturu samih limfocita te onih tretiranih inhibitorom puta Notch, kako bi se utvrdilo utječe li aktivacija puta Notch ligandom JAGGED1 na biologiju limfocita.

(41 stranica, 15 slika, 4 tablice, 51 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: Notch, signalni put, kokultura, leukemija, B-ALL
Voditelj: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić
izv. prof. dr. sc. Goran Kovačević
doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević
Rad prihvaćen: 13. 2. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

CLONING OF THE LIGAND *JAGGED1* AND ITS EFFECT ON THE PROLIFERATION OF LYMPHOCYTES

Maja Šetinc
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Notch signaling pathway plays a crucial role in the determination of the cell fate in many tissues. Depending on the cell type, activation of Notch signaling can result in cell differentiation, proliferation or apoptosis. Notch receptors are transmembrane proteins with a large extracellular ligand-binding domain which binds to the ligand on the neighbouring cell. When a ligand binds to a receptor, the intracellular domain of the receptor is proteolytically cleaved and travels to the nucleus. There it binds CSL transcription factor and in that manner regulates gene transcription. Notch ligands belong to two families – "Delta-like" ligands (DLL) and Jagged. Notch signaling pathway plays an important role in the blood cell differentiation, and misregulations of that process could lead to malignant transformation and development of leukemia. The aim of this thesis was to analyse the effect of JAGGED1 ligand on the lymphocyte proliferation and activation of Notch signaling pathway. An expression plasmid with a coding sequence *JAGGED1* was constructed, and leukemic B-lymphocytes were cocultured with adherent cell expressing JAGGED1 ligand. Proliferation of lymphocytes in coculture was analyzed in comparison with proliferation of lymphocytes grown alone, and lymphocytes treated with Notch inhibitor, to determine the effect of JAGGED1 ligand signaling on the lymphocyte biology.

(41 pages, 15 figures, 4 tables, 51 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: Notch, signaling pathway, coculture, leukemia, B-ALL
Supervisor: Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD
Reviewers: Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD
Assoc. Prof. Goran Kovačević, PhD
Doc. Sofia Ana Blažević, PhD
Thesis accepted: 13. 2. 2019.

SADRŽAJ

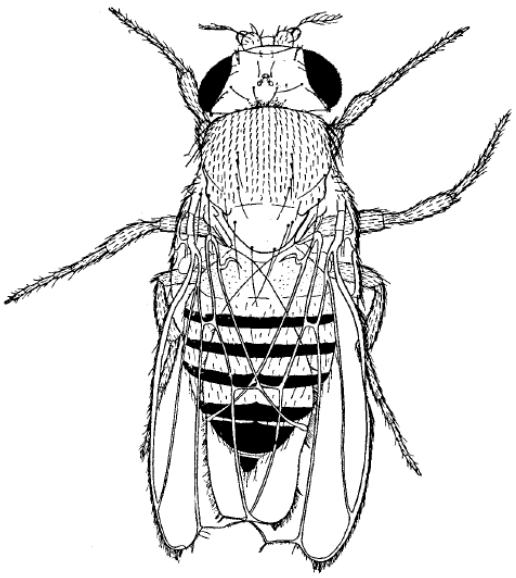
1. UVOD ... 1
1.1. Signalni put Notch ... 1
1.2. Receptori Notch ... 3
1.3. Ligandi receptora Notch ... 5
1.3.1. Ligand JAGGED1 ... 6
1.4. Razvoj krvnih stanica ... 7
1.5. Cilj istraživanja ... 8
2. MATERIJALI I METODE ... 9
2.1. Konstrukcija plazmida ... 9
2.1.1. Lančana reakcija polimerazom ... 9
2.1.2. Pročišćavanje produkta lančane reakcije polimerazom ... 10
2.1.3. Digestija restrikcijskim enzimom EcoRI i ligacija inserta od interesa i plazmida ... 10
2.1.4. Transformacija bakterija i izolacija plazmida ... 11
2.2. Transfekcija stanica ... 12
2.3. Izolacija DNA iz transficiranih stanica ... 13
2.4. Izolacija staničnih proteina i određivanje njihove koncentracije prema metodi Bradford ... 13
2.5. Westernska metoda otiska ... 14
2.5.1. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu ... 14
2.5.2. Prijenos proteina na membranu ... 15
2.5.3. Imunodetekcija proteina na membrani ... 16
2.6. Uzgoj stanica u kokulturi ... 17
3. REZULTATI ... 18
3.1. Konstrukcija plazmida ... 18
3.2. Ekspresija gena *JAGGED1* u stanicama mišjih fibroblasta A9 ... 21
3.2.1. Analiza ekspresije proteina JAGGED1 u stanicama mišjih fibroblasta A9 metodom "western blot" ... 22
3.2.2. Računalna obrada sekvencije plazmida pcDNA3-JAGGED1 ... 23
3.3. Analiza ekspresije proteina JAGGED1 u stanicama glioblastoma A1235 metodom "western blot" ... 24
3.4. Proliferacija limfocita u kokulturi sa stanicama glioblastoma A1235 ... 25
4. RASPRAVA ... 29
5. ZAKLJUČAK ... 34
LITERATURA ... 35
PRILOZI ... 39
ŽIVOTOPIS ... 41

1. UVOD

Višestanični organizmi započinju svoj život kao jedna stanica. Njenom diobom nastaju stanice iste nasljedne upute, ali specijalizirane za različite funkcije kroz procese diferencijacije. Usmjeravanje stanica prema različitim staničnim sudbinama uvođenjem morfoloških i funkcionalnih razlika jedan je od najvažnijih razvojnih mehanizama (Sjörqvist i Andersson, 2017). Važnu ulogu u određivanju stanične sudbine u brojnim tkivima ima signalni put Notch (Guruharsha i sur., 2012; Sjörqvist i Andersson, 2017). Receptori i ligandi ovog signalnog puta visoko su konzervirani od beskralježnjaka do sisavaca (Guruharsha i sur., 2012).

1.1. Signalni put Notch

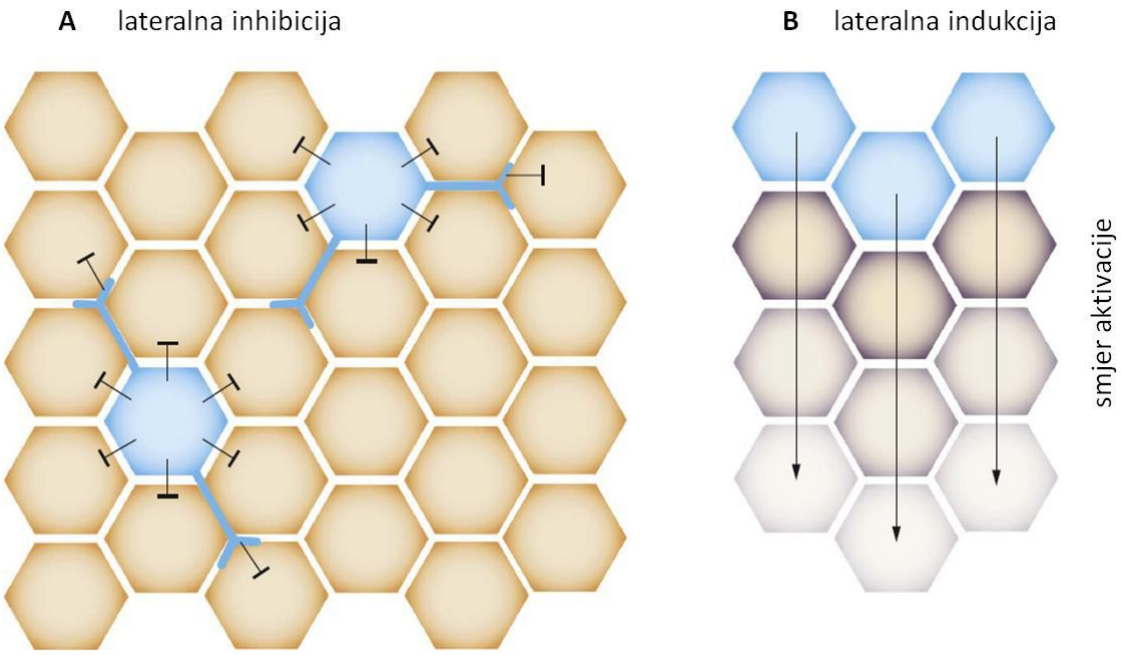
1914. godine John S. Dexter zapazio je i opisao mutanta vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) s urezima (eng. *nothches*) na rubovima krila (Slika 1.) (Dexter, 1914). Nekoliko je godina kasnije poznati genetičar Thomas Hunt Morgan otkrio da je ovakav fenotip rezultat djelomičnog gubitka funkcije gena *Notch*, te je identificirao alele gena *Notch* u genomu vinske mušice.



Slika 1. Ženka vinske mušice s mutacijom u genu *Notch*. Preuzeto iz Morgan, 1917.

Embrionalni razvoj višestaničnih organizama složeni je proces. Kako bi se svi dijelovi novog organizma pravilno formirali potrebno je lokalizirano i precizno djelovanje morfogenih signala. Jedan od tih signala je put Notch. Signalni put Notch sastoji se od relativno malog broja signalnih stepenica, a njegova aktivacija započinje aktivacijom receptora vezanjem liganda. Ligandi receptora Notch prezentirani na površini stanice vežu se za receptore Notch susjedne stanice (Sjörqvist i Andersson,

2017) i jukstakrino aktiviraju signalizaciju. Signalni put Notch djeluje mehanizmom lateralne inhibicije i indukcije. Lateralna inhibicija proces je kojim se stanice susjedne stanici koja je izvor signala usmjeravaju prema sudbini različitoj od nje. Aktivacija receptora signalnog puta Notch rezultira smanjenom ekspresijom liganada signalnog puta Notch na membrani iste stanice. Tako dolazi do razlike u količini liganada i receptora eksprimiranih na membranama stanica unutar jedne populacije stanica, do te mjere da se stanice mogu podijeliti na one koje induciraju signal i one koje ga primaju (Slika 2.). Lateralnom indukcijom susjedne stanice poprimaju istu sudbinu kao stanica koja je izvor signala. Aktivacija receptora signalnog puta Notch rezultira povećanom ekspresijom liganada signalnog puta Notch na membrani te stanice, pa dolazi do daljnje aktivacije signalnog puta Notch u okolnim stanicama (Slika 2.) (Sjörqvist i Andersson, 2017).



Slika 2. Jukstakrino djelovanje signalnog puta Notch. A: lateralna inhibicija proces je kojim se u prvobitno jednolikoj populaciji stanica izdvoje stanice (označene plavom bojom) koje aktivacijom signalnog puta Notch spriječe okolne stanice (označene naranačastom bojom) da preuzmu istu staničnu sudbinu. B: lateralna indukcija proces je kojim stanice (označene plavom bojom) aktivacijom signalnog puta Notch susjedne stanice (označene ljubičastom bojom) u populaciji potiču da preuzmu istu staničnu sudbinu. Preuzeto i prilagođeno prema Sjörqvist i Andersson, 2017.

Aktivacija receptora signalnog puta Notch inducira promjenu ekspresije gena u jezgri (Fan i sur., 2018). Odgovor stanica na aktivaciju signalnog puta Notch različit je ovisno o tipu stanica i njihovom kontekstu. Najčešći odgovor na aktivaciju puta je diferencijacija, proliferacija ili odlazak stanice u apoptozu (Guruharsha i sur., 2012; Piovan i sur., 2018). No, biološki učinci aktivacije signalnog puta Notch ovise i o trenutku aktivacije, jačini signala, kombinaciji receptora i liganda, post-translacijskim

modifikacijama receptora ili o specifičnoj regulaciji nizvodnih gena na transkripcijskoj i post-transkripcijskoj razini (Hossain i sur., 2018).

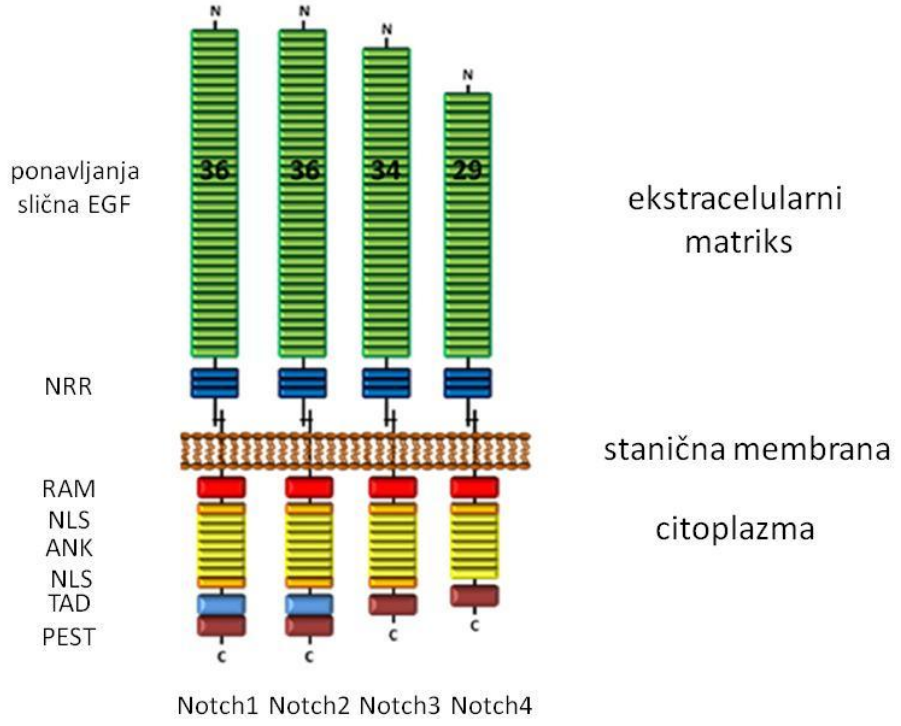
Signalni put Notch igra ključnu ulogu u razvoju višestaničnih organizama. Uz signalne putove Wnt i FGF djeluje kao mehanizam regulacije prilikom segmentacije embrija i nastajanja somita, što je konzervirana razvojna faza u svih kralježnjaka (Carrieri i Dale, 2017). Aktivacija ovog signalnog puta bitna je za pravilan razvoj i održavanje homeostaze u više organskih sustava. Tako npr. regulira diferencijaciju stanica živčanog sustava i formaciju mijelina (Dumortier i sur. 2005; Fan i sur., 2018). U neuralnim prekursorskim stanicama potiče njihovu diferencijaciju u glija stanice, dok prekursorske stanice bez aktivirane signalizacije diferenciraju u neurone (Crawford i Roelink, 2007). Put Notch sudjeluje u regulaciji hematopoeze djelujući i na krvotvorne matične stanice i na stanice progenitore (Chiaramonte i sur., 2005). Novija istraživanja pokazuju da signalni put Notch igra ulogu i u održavanju matičnih stanica i određivanju njihove sudbine (Guruharsha i sur., 2012; Platonova i sur., 2017).

Poremećaji aktivnosti signalnog puta Notch mogu se povezati s brojnim tumorima i pojedinim vrstama leukemija, te nasljednim sindromima (Guruharsha i sur., 2012). Sve više istraživanja ukazuje na mogućnost primjene signalnog puta Notch kao mete za antitumorsku terapiju (Rosati i sur., 2008; Guruharsha i sur., 2012). Zbog velike uloge ovog signalnog puta u održavanju homeostaze organizma već bi mala modulacija signalizacije mogla imati značajne učinke pri suzbijanju proliferacije tumorskih stanica i tumorske angiogeneze (Guruharsha i sur., 2012; Ein Oon i sur., 2017).

1.2. Receptori Notch

Skupina gena *Notch* kodira za nekoliko različitih transmembranskih proteina koji su evolucijski vrlo očuvani među beskralježnjacima i kralježnjacima (Dumortier i sur. 2005). U sisavaca, porodica receptora Notch sastoji se od 4 transmembranska proteina, Notch 1, 2, 3 i 4 (Dumortier i sur. 2005; Rosati i sur., 2008). Svaki od njih se sintetizira kao jedan prekursorski protein koji se tijekom transporta do stanične membrane cijepa u trans cisterni Golgijevog aparata proteazom sličnom furinu. To cijepanje rezultira formacijom heterodimera koji je povezan vezama ovisnima o Ca^{2+} (Carrieri i Dale, 2017; Steinbuck i Winandy, 2018). Receptori Notch građeni su od velike ekstracelularne domene koja veže ligande, transmembranske, te intracelularne domene (NICD) (Slika 3.). Ekstracelularna domena sastoji se od 29 do 36 tandemskih ponavljanja sličnih epidermalnom faktoru rasta (EGF-*like*) i 3 ponavljanja LIN12/Notch koja sprječavaju signaliziranje neovisno o ligandu, pa se nazivaju negativnom regulatornom regijom (NRR). Intracelularna domena (NICD) sastoji se od 2 peptida za lokalizaciju u jezgri (*nuclear localization sequence*, NLS), domene RAM, nekoliko ankirinskih ponavljanja koji služe za interakciju s transkripcijskim faktorima, transaktivacijske

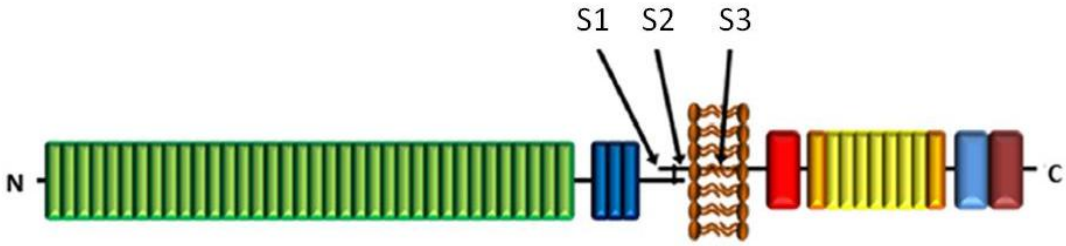
domene (kod receptora Notch 1 i Notch 2), te sekvencije prolin-glutaminska kiselina-serin-treonin (PEST) na C kraju molekule, zadužene za stabilnost proteina (Dumortier i sur. 2005; Sjörqvist i Andersson, 2017). Još jedna uloga sekvencije PEST je brzo prepoznavanje aktivirane domene NICD od strane E3-ubikvitin ligaze, kako bi trajanje signala bilo što kraće (Radtke i sur., 2010). Receptori Notch koji se ne aktiviraju konstitutivno se internaliziraju, ubikvitiniziraju i degradiraju u lizosomima (Carrieri i Dale, 2017).



Slika 3. Receptori Notch. Ekstracelularna domena receptora građena je od ponavljanja sličnih epidermalnom faktoru rasta i negativne regulatorne regije (NRR). Intracelularna domena građena je od domene RAM, 2 peptida za lokalizaciju u jezgri (NLS), ankirinskih ponavljanja (ANK), transaktivacijske domene (TAD), te sekvencije prolin-glutaminska kiselina-serin-treonin (PEST). Preuzeto iz Steinbuck i Winandy, 2018.

Prilikom vezanja liganda i receptora dolazi do dva sukcesivna proteolitička cijepanja receptora (Slika 4.). Receptor se prvo cijepa metaloproteinazom ADAM između 12. i 13. aminokiseline ekstracelularnog dijela membrane (brojano od membrane), u negativnoj regulatornoj regiji. Ekstracelularni dio receptora se odvaja i endocitozom ulazi u stanicu koja eksprimira ligand (Radtke i sur., 2010). Cijepanje metaloproteinazom otkriva mjesto cijepanja γ- sekretaze, te dolazi do proteolitičkog cijepanja receptora unutar transmembranske domene i oslobađanja intracelularne (NICD) domene, koja zatim putuje u jezgru (Radtke i sur., 2010; Steinbuck i Winandy, 2018). Signalni put Notch ne koristi sekundarne glasnike, već glavnu ulogu u prenošenju signala ima domena

NICD. U jezgri se domena NICD veže s transkripcijskim faktorom CSL, DNA-vezujućim kompleksom Mastermind (MAM), i nekoliko transkripcijskih faktora koji sudjeluju u aktivaciji transkripcije nizvodnih gena ovisnih o signalnom putu Notch (Dumortier i sur. 2005; Zweidler-McKay i sur., 2005; Carrieri i Dale, 2017). Mnogi nizvodni geni još nisu poznati, ali neki od utvrđenih su pozitivni regulatori proliferacije i preživljavanja poput *c-Myc* i *Bcl2*, (Fabbri i sur., 2011; Horvat i sur., 2018; Montaño i sur., 2018), regulator staničnog ciklusa *Cdkn1a* (Dumortier i sur. 2005), ili su uključeni u nizvodnu regulaciju signalnih putova koji promoviraju preživljenje (Platonova i sur., 2017). Neki od najbolje istraženih nizvodnih gena signalnog puta Notch su transkripcijski faktori *HES* (*hairy enhancer of split*) (Dumortier i sur. 2005; Zweidler-McKay i sur., 2005), *Sox9* i *Pax6* (Liu i sur., 2014). Jačina aktivacije signala Notch ovisi i o receptoru i o vrsti liganda (Sjörqvist i Andersson, 2017).



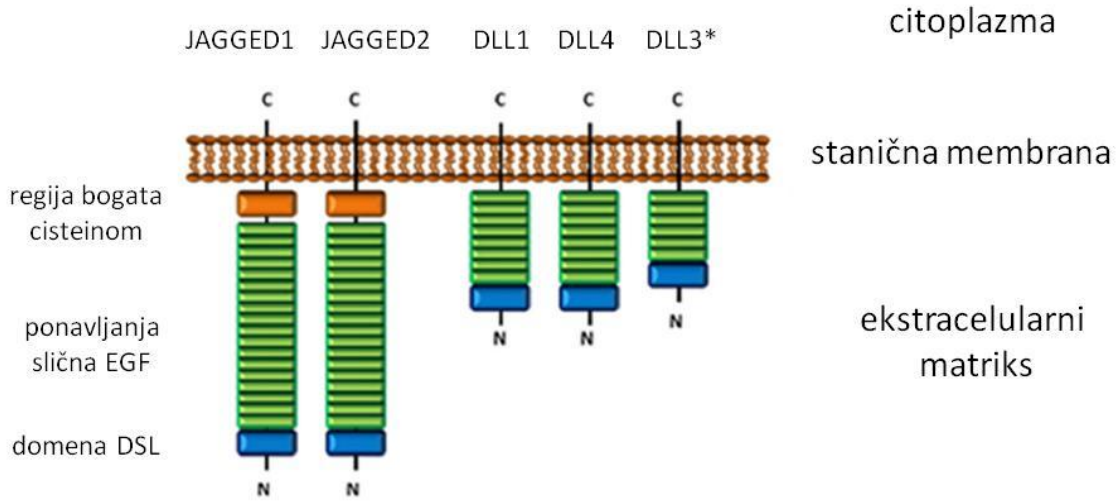
Slika 3. Mjesta cijepanja receptora Notch. S1: mjesto cijepanja proteaze slične furinu tijekom transporta do stanične membrane ponavljanja; rezultira stvaranjem heterodimera. S2: mjesto cijepanja metaloproteinaze ADAM prilikom vezanja receptora i liganda; otkriva se mjesto cijepanja S3. S3: mjesto cijepanja γ- sekretaze; dolazi do oslobađanja intracelularne domene receptora Notch. Preuzeto iz Steinbuck i Winandy, 2018.

1.3. Ligandi receptora Notch

Ligandi receptora Notch pripadaju porodici DSL (Delta, Serrate, Lag2), a kod sisavaca se dijele se u dvije skupine – "Delta-like" i Jagged. Ligandi "Delta-like" su DLL1, DLL3 i DLL4, a ligandi Jagged JAGGED1 i JAGGED2 (Dumortier i sur., 2005; Sjörqvist i Andersson, 2017). Ligandi, kao i receptori, transmembranski su proteini (Slika 5.). Na N-terminalnoj, ekstracelularnoj strani liganda nalazi se domena DSL, koja je zajedno s prva dva atipična ponavljanja domene slične EGF ključna za interakciju između liganda i receptora. Ova su ponavljanja nazvana domenama Delta i OSM-11 (Carrieri i Dale, 2017; Sjörqvist i Andersson, 2017). Ligandi "Delta-like" i Jagged međusobno se razlikuju u broju ponavljanja sličnih EGF i postojanju regije bogate cisteinom u ekstracelularnoj domeni liganda Jagged (Dumortier i sur., 2005). Obje skupine liganada receptora Notch imaju C-terminalnu veznu domenu PDZ unutar svoje intracelularne domene. Domena PDZ služi ligandima za interakciju s ostalim staničnim proteinima. Ligandi Jagged i Delta-like razlikuju se u

aminokiselinskim strukturama domene PDZ, pa tako i u proteinima s kojima stupaju u interakciju. Zato se, unatoč velikoj sličnosti, mogu razlikovati u funkciji (Sjörqvist i Andersson, 2017).

Ligandi i receptori Notch povezuju se vezom koja postaje jača ako se na nju vrši pritisak. Takva vrsta povezivanja naziva se držećom vezom (*catch-bond*). Ovakav način vezanja utječe i na sam signalni put. Formacija veze između liganda i receptora uključuje konformacijske promjene liganda koji poput kuke povlači ekstracelularnu domenu receptora k sebi. Ta se sila prenosi molekulom receptora i uzrokuje otkivanje mjesta cijepanja metaloproteinaze ADAM, te tako osigurava aktivaciju signalnog puta (Luca i sur., 2017). Ligandi Jagged i DLL razlikuju se jačinom vezanja receptora Notch, pa tako i silom potrebnom za aktivaciju signalizacije.



Slika 5. Ligandi receptora Notch. Podijeljeni su u dvije skupine – Jagged i "Delta-like" (DLL). Transmembranski su proteini s velikom ekstracelularnom domenom građenom od ponavljanja domene slične EGF i domene DSL ključne za interakciju s receptorom. Ligandi Jagged imaju regiju bogatu cisteinom, dok je ligandi DLL nemaju. *DLL3 eksprimiran je samo u unutarstaničnim odjeljcima. Preuzeto iz Steinbuck i Winandy, 2018.

1.3.1. Ligand JAGGED1

Ligand JAGGED1 pripada porodici transmembranskih liganada DSL koji aktiviraju receptore Notch. Ligandi JAGGED kod sisavaca homolozi su ligandu Serrate kod vinske mušice, gdje su prvi put zapaženi (Lindsell i sur., 1995). Ekstracelularna domena liganda JAGGED1 sadrži regiju bogatu cisteinom iza ponavljanja sličnih EGF, čija je funkcija još nepoznata. Vezanje liganda Serrate, homologa liganda JAGGED, za receptore Notch slabije je od vezanja liganda Delta, homologa liganda "Delta-like", koji nemaju regiju bogatu cisteinom. To navodi na zaključak da, iako regija bogata cisteinom nije ključna za vezanje liganda za receptor, moguće modulira interakciju liganda i receptora

(Lindsell i sur., 1995). Ligand JAGGED1 prolazi niz konformacijskih promjena prilikom vezanja s receptorom Notch kako bi se postigla držeća veza i aktivirao signalni put (Luca i sur., 2017).

Sposobnost liganda JAGGED1 da aktivira signalni put Notch ovisi o glikozilacijskom statusu ekstracelularne domene receptora Notch. Proteini Fringe su glikozil-transferaze koje dodaju N-acetilglukozamin na O-fukozu unutar nekih ponavljanja sličnih EGF receptora Notch. Tako glikozilirani receptori Notch preferencijalno vežu ligande "Delta-like", dok je aktivacija signalnog puta Notch ligandom JAGGED1 inhibirana (Radtke i sur., 2010; Liu i sur., 2017).

Ligandi Jagged, kao i ligandi "Delta-like", nakon vezanja s receptorima Notch proteolitički se cijepaju jednom od verzija metaloproteinaze ADAM i γ-sekretazom (LaVoie i Selkoe, 2003). Sam proces proteolitičkog procesiranja liganda Jagged slabo je istražen. Iako se nagađa da bi dobiveni solubilni fragment liganda mogao imati ulogu u modulaciji signalnog puta Notch (LaVoie i Selkoe, 2003), funcionalni značaj cijepanja liganda u intramembranskoj regiji i odvajanja ekstracelularne domene liganda još uvijek je nepoznanica (Boyer-Di Ponio i sur., 2007). Prevladavajuća hipoteza tvrdi da cijepanje liganda i endocitoza ekstracelularne domene liganda stvara vlačnu silu na receptor, čime dolazi do konformacijske promjene negativne regulatorne regije receptora i otkivanja mjesta cijepanja za metaloproteinazu ADAM (Kovall i sur., 2018).

Ekspresija liganda JAGGED1 pronađena je u osteoblastima u koštanoj srži. S povećanim brojem osteoblasta koji eksprimiraju JAGGED1 korelira i povećani broj hematopoetskih matičnih stanica. To ukazuje na ulogu ovog liganda u održavanju hematopoetske niše u koštanoj srži (Mancini i sur., 2005; Abe i sur., 2010).

1.4. Razvoj krvnih stanica

Signalni put Notch ima važnu ulogu u pravilnom razvoju krvnih stanica. Diferencijacija krvnih stanica vrlo je složen proces koji mora biti strogo reguliran (Zweidler-McKay i sur., 2005). U hematopoetskim stanicama, glavna uloga signalnog puta Notch je usmjeravanje prekursora limfocita u smjeru T-limfocita (Taghon i sur., 2005). Put Notch aktivira se u stanicama progenitorima limfoidne linije i potiče njihovu diferencijaciji u T-limfocite, te je potreban za sazrijevanje T-limfocita u timusu (Koyanagi i sur., 2012). Iako su na epitelnim stanicama timusa eksprimirani različiti ligandi receptora Notch, za razvitak T-limfocita ključna je interakcija recptora Notch s ligandima "Delta-like" (Lehar i sur., 2005). Bez signalizacije Notch stanice progenitori u koštanoj srži diferenciraju u B-limfocite (Chiaramonte i sur., 2005; Lehar i sur., 2005). Iako u principu nije aktivan kod B-limfocita, signalni put Notch ipak igra ulogu i u određenim fazama razvoja B-limfocita, kao i ostalih krvnih stanica. Regulira diferencijaciju mijeloidne linije stanica, te ih štiti od odlaska u apoptozu (Chiaramonte i sur.,

2005). Također, aktivnost puta Notch ključna je za održavanje mijeloidnih progenitora u nediferenciranom stanju (Hossain i sur., 2018).

Pogreške u regulaciji signalnog puta Notch mogu pogodovati nastanku tumora. Konstitutivna aktivacija signalnog puta Notch povezana je s akutnim leukemijama T-limfocita (T-ALL), i kroničnim leukemijama B-limfocita (B-CLL) (Horvat i sur., 2018; Piovan i sur., 2018). S druge strane, nađeno je da pojedini tipovi leukemijskih B-limfocita aktivacijom nizvodnih meta puta Notch idu u apoptozu. Koje su posljedice aktivacije puta Notch kod leukemijskih B-limfocita i je li prisutnost liganda u staničnom okolišu dovoljna za aktivaciju puta, još uvijek je predmet istraživanja (Zweidler-McKay i sur., 2005; Rosati i sur., 2008).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati utjecaj liganda JAGGED1 na proliferaciju limfocita i aktivaciju signalnog puta Notch. U prvom dijelu istraživanja konstruiran je ekspresijski plazmid sa sekvencijom liganda *JAGGED1*, te su njime transficirane adherentne stanice koje normalno ne eksprimiraju ligand JAGGED1, stanice mišjih fibroblasta linije A9. Metodom "western blot" analizirala se ekspresija liganda JAGGED1 u transficiranim stanica, te u ostalim dostupnim adherentnim staničnim linijama. U drugom dijelu istraživanja pratila se proliferacija leukemijskih B-limfocita u kokulturi sa stanicama koje imaju eksprimiran ligand JAGGED1, u prisustvu i odsustvu inhibitora gama sekretaze, tj. inhibitora signalizacije puta Notch, da bi se utvrdio njegov utjecaj na fiziologiju limfocita B.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Konstrukcija plazmida

2.1.1. Lančana reakcija polimerazom

Kodirajuća sekvencija *JAGGED1* (3657 pb) (Prilog 1.) umnožena je lančanom reakcijom polimerazom (*polymerase chain reaction*, PCR) pomoću polimeraze *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) i specifično dizajniranih početnica za ljudski gen *JAGGED1*. Početnice su dizajnirane tako da se krajevima umnoženog inserta pridodala sekvencija koju prepoznaje restrikcijski enzim *EcoRI*. Efikasnost početnica provjerena je *in silico*, u računalnom programu AmplifX (Jullien, verzija 1.7.0). Kao kalup za lančanu reakciju polimerazom korištena je već postojeća cDNA dobivena reverznom transkripcijom RNA izolirane iz tri tipa ljudskih stanica (stanične linije Jurkat i A1235, te primarnih timocita). Reakcijska smjesa za PCR sastojala se od 5 µl 5x Q5 reakcijskog pufera (New England Biolabs), 5 µl 5x *Q5 High GC Enhancer* (New England Biolabs), 0,5 µl dNTP (10 mM), 1,25 µl uzvodne početnice (F: 5' GAATTCATGCGTTCCCCACGGAC 3', T_m = 60 °C (10 µM)), 1,25 µl nizvodne početnice (R: 5' GAATTCCTATACGATGTACTCCATTCGG 3', T_m = 57 °C (10 µM)), 6 µl kalupa cDNA i 0,25 µl (0.02 U/µl) polimeraze *Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), te je nadopunjena vodom do ukupnog volumena od 25 µl. Reakcija se odvijala u uređaju ProFlex (Applied Biosystems) prema programu u Tablici 1.

Tablica 1. Program lančane reakcije polimerazom pomoću polimeraze Q5 *Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase*

Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
98 °C	30 s	1x
98 °C	10 s	**3x**
58 °C	30 s	
72 °C	2,5 min	
98 °C	10 s	**10x**
60 °C	30 s	
72 °C	2,5 min	
98 °C	10 s	**10x**
65 °C	30 s	
72 °C	2,5 min	
72 °C	2 min	1x

Tokom prvih ciklusa reakcije temperatura prianjanja početnica odgovarala je izračunatoj temperaturi taljenja početnica. Nakon tri inicijalna ciklusa umnožavanja, temperatura prianjanja je povećana za 2 °C, a nakon 10 ciklusa za još 5 °C. Ovakva vrsta PCR reakcije naziva se *touch-up* gradijentni PCR. Početni ciklusi na nižoj temperaturi prianjanja pružaju blaže uvjete za lakši početak reakcije umnožavanja, dok kasniji ciklusi na višoj temperaturi doprinose specifičnosti reakcije (Rowther i sur., 2012).

2.1.2. Pročišćavanje produkta lančane reakcije polimerazom

Veličina dobivenog produkta provjerena je agaroznom gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu (0,5 g agaroza (Sigma-Aldrich), 50 ml pufer 1x TAE (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0), 2,5 µl etidijev bromid (10 mg/ml). Elektroforeza se odvijala u 1x TAE puferu, tijekom 25 minuta uz stalni napon od 100 V. Za vizualizaciju DNA u gel je dodan etidijev bromid. Kao standard veličine korišten je 1 kb DNA standard (New England Biolabs). Produkt reakcije PCR pročišćen je nakon elektroforeze gela pomoću kompleta *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) prema protokolu proizvođača. Vrpca DNA produkta reakcije PCR jasno je vidljiva nakon bojanja gela etidijevim bromidom pod UV svjetlom u transiluminatoru. Vrpca je pažljivo izrezana iz gela i stavljena u čistu mikroepruvetu. Komadić gela je izvagan, i dodana mu je otopina *Membrane Binding Solution* (4.5 M gvanidin izotiocijanat, 0.5 M kalij acetat (pH 5.0)) u omjeru 1 µl otopine : 1 mg gela. Sadržaj mikroepruvete dobro je pomiješan na vortex miješalici. Slijedila je inkubacija u termobloku na 60 °C tijekom nekoliko minuta, dok se sav gel nije otopio. Cijeli sadržaj mikroepruvete stavljen je u kolonicu za centrifugiranje. Kolonica je odstajala 1-2 minute kako bi se DNA vezala za membranu, a zatim je centrifugirana 1 minutu na 16000 g. Na kolonicu je dodano prvo 700 µl, zatim 500 µl otopine *Membrane Wash Solution* (10 mM kalij acetat (pH 5.0), 80 % etanol, 16.7 µM EDTA (pH 8.0)), uz centrifugiranje od 1 min na 16000 g. U kolonicu je zatim dodano 40 µl vode bez nukleaza, ostavljena je da odstoji 1-2 minute te je centrifugirana 1 minutu pri 16000 g. Pročišćenoj DNA izmjerena je koncentracija i čistoća na spektrofotometrijskom uređaju NanoVue (GE Life Sciences).

2.1.3. Digestija restrikcijskim enzimom EcoRI i ligacija inserta od interesa i plazmida

Pročišćeni fragment DNA pocijepan je restrikcijskim enzimom *EcoRI*. Korišteno je 0,2 U/µl *EcoRI HF* (New England Biolabs) i odgovarajući pufer 1x CutSmart (10x, New England Biolabs). Digestija se odvijala 1 sat pri 37 ° C.

Plazmid pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific, 5446 pb) pocijepan je s *EcoRI*, te su mu slobodni krajevi defosforilirani goveđom crijevnom alkalnom fosfatazom CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, 30 U/µl; TaKaRa), kako bi se spriječila recirkularizacija praznih plazmida. Za 10 µl pcDNA3 dodano

je 0,1 µl enzima CIAP, te se reakcija odvijala 5 minuta na 37 °C. Uslijedila je inaktivacija alkalne fosfataze inkubacijom tijekom 15 minuta na 65 °C. Cijepanje plazmida provjereno je elektroforezom na 1% agaroznom gelu, te je linearizirani plazmid pročišćen iz gela kompletom *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega).

Pocijepani insert od interesa inkubiran je 20 minuta na 65 °C kako bi se inaktivirao *EcoRI*. Insert i linearizirani plazmid pcDNA3 pomiješani su u omjeru 2:1 (izračunato u programu *Ligation Calculator,* Genelink), te je za ligaciju korištena T4 DNA ligaza (Promega) i 10x pufer (300 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP). Ligacija se odvijala tokom noći na 15 °C.

2.1.4. Transformacija bakterija i izolacija plazmida

Napravljena je transformacija kemijski kompetentnih bakterija *E. coli* XL10 Gold, i bakterijske kulture su ostavljene da preko noći rastu na 37 °C na pločama medija LB (CARL ROTH) s ampicilinom (100 µg/ml) kao antibiotskom selekcijom. Drugi dan nasumično su odabrane kolonije od kojih su uzgojene prekonoćne kulture u 3 ml tekućeg medija LB s ampicilinom. Iz prekonoćnih kultura izolirani su plazmidi po protokolu Miniprep (Sambrook i sur., 2001). Prekonoćne kulture su centrifugirane i bakterije su oborene u talog koji je resuspendiran u 100 µl otopine GTE (50 mM glukoza, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5)). Resuspendirana smjesa inkubirana je 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim joj je dodano 200 µl pufera za lizu (0.2 M NaOH, 1% SDS). Smjesa je pomiješana okretanjem i inkubirana na ledu 5 minuta. Dodano je 150 µl ledeno hladne otopine kalijevog acetata (omjera 3 M kalij : 5 M acetat), te je smjesa ponovo pomiješana okretanjem i inkubirana na ledu 5 minuta. Slijedilo je centrifugiranje od 15 minuta na 14000 g, nakon koje je supernatant odvojen u čistu mikroepruvetu. Dodana su mu 2 volumena 96% etanola, i smjesa je ostavljena na ledu nekoliko minuta kako bi se potaknulo taloženje plazmidne DNA. Zatim je uslijedilo centrifugiranje od 15 minuta na 14000 g. Dobiveni talog plazmidne DNA otopljen je u 30 µl vode s RNAzom A (20 µg/ml).

Veličine dobivenih plazmida provjerene su elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu, i utvrđeni plazmidi s ugrađenim insertom, čija veličina iznosi 9109 pb.

S ploče su odabrane kolonije bakterija za koje je utvrđeno da sadrže plazmid sa željenim fragmentom DNA, te su ponovo uzgojene prekonoćne kulture. Plazmidi su izolirani pomoću kompleta za izolaciju *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Prekonoćne kulture su centrifugirane i bakterijski je talog resuspendiran u 250 µl otopine za resupendiranje stanica (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaza A). Resuspendiranoj otopini dodano je 250 µl pufera za lizu (0.2 M NaOH, 1 % SDS), smjesa je promiješana okretanjem i inkubirana do 5 minuta na

sobnoj temperaturi. Kada se otopina djelomično razbistrila, dodano joj je 10 µl otopine alkalne proteaze, te je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Otopini je zatim dodano 350 µl otopine za neutralizaciju (4.09 M guanidin hidroklorid, 0.759 M kalij acetat, 2.12 M ledena octena kiselina, pH= 4,2) te je smjesa pomiješana okretanjem. Uslijedilo je centrifugiranje 10 minuta na 14000 g. Supernatant je zatim odvojen u kolonice za pročišćavanje plazmida i centrifugiran 1 minutu na 16000 g. Kolonice su isprane sa 750 µl, zatim 250 µl otopine za ispiranje (60 % etanol, 60 mM kalij acetat, 8.3 mM Tris-HCl, 0.04 mM EDTA). Kolonica je preseljena u čistu mikroepruvetu, te je plazmid eluiran u 100 µl vode bez nukleaza centifugiranjem 1 minutu na 16000 g.

Plazmidi su zatim pocijepani specifičnim restrikcijskim enzimom BglII kako bi se utvrdila orijentacija ugrađenog inserta. U reakciji je korišteno 0,2 U/µl BglII (New England Biolabs), odgovarajući pufer 1x NEBuffer 3 (10x, New England Biolabs) i 1x BSA (100x, New England Biolabs). Reakcija se odvijala 1 sat pri 37 ° C. BglII cijepa pcDNA3-JAGGED1 na dva mjesta, i ovisno o orijentaciji inserta daje različite restrikcijske fragmente, koji su analizirani agaroznom gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Pripremljen je alikvot plazmida s pravilno orijentiranim insertom gena *JAGGED1* koncentracije 100 ng/µl, i plazmid je sekvenciran u tvrtki Macrogen (Koreja).

2.2. Transfekcija stanica

Plazmidom za koji je utvrđeno da sadrži kodirajuću sekvenciju *JAGGED1* (9013) transficirane su stanice mišjih fibroblasta stanične linije A9. Za transfekciju je korišten komplet *Lipofectamine™ 3000 Reagent* (Thermo Fisher Scientific) prema protokolu proizvođača. U bunarčiću pločice za uzgoj stanica s 24 bunarčića prethodno su nasađene stanice A9 i uzgajane do konfluentnosti. 1 µl reagensa Lipofectamine 3000 razrijeđen je u 25 µl medija Opti-MEM. U 50 µl medija Opti-MEM dodano je 500 ng plazmidne DNA i 1 µl reagensa P3000. 25 µl razrjeđenja DNA u mediju Opti-MEM pomiješano je s razrjeđenjem reagensa Lipofectamine 3000, i smjesa je inkubirana 12 minuta na sobnoj temperaturi. Svih 50 µl smjese zatim je dodano stanicama A9. Kako bi se mogla provjeriti uspješnost transfekcije, mišji fibroblasti A9 transficirani su usporedno plazmidom pCDNA3-RFP, koji umjesto željenog inserta nosio sekvenciju za crveni fluorescentni protein. 24 sata nakon transfekcije stanice su presađene u bočicu T25, a 48 sati nakon transfekcije dodan im je antibiotik, geneticin (G418 disulfat; Calbiochem) radi selekcije transficiranih stanica. Prethodno je napravljena titracijska krivulja kojom je utvrđena optimalna koncentracija geneticina za staničnu liniju A9, a ona iznosi 40 µg/ml. Stanice su rasle u uvjetima selekcije 14 dana. Tada su jasno vidljive kolonije stanica, koje se pojedinačno presađuju u bunarčiće pločice za uzgoj stanica s 24 bunarčića, u 500 µl medija. Njihovim

uzgojem dobivamo klonalne linije transficiranih stanica. Nakon 5 dana rasta, iz bunarčića se stanice presađuju u male petrijeve zdjelice.

2.3. Izolacija DNA iz transficiranih stanica

Kada su stanice u bunarčićima pločice za uzgoj postale konfluentne, tripsinizacijom su se odvojile od podloge i centrifugiraju 5 minuta na 1500 rpm (Hettich ROTINA 420). Na talog stanica dodalo se 75 µl digestijskog pufera (50 mM Tris - pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5 % Tween 20) i 2 µl proteinaze K (20 mg/ml, Thermo Fisher Scientific). Stanice su se u digestijskom puferu inkubirale preko noći uz protresanje (300 rpm) u termobloku na 37 °C. Zatim se smjesa inkubirala 8 minuta na 95 °C kako bi se inaktivirala proteinaza K, te se centrifugirala 3 minute na 1700 rpm. Supernatant koji sadrži izoliranu DNA je prebačen u čistu mikroepruvetu od 1,5 ml i korišten kao kalup za lančanu reakciju polimerazom za dokazivanje prisutnosti plazmida u transficiranim stanicama. Za lančanu reakciju polimerazom korištene su specifično dizajnirane početnice za promotor CMV plazmida pcDNA3 i za ljudski gen *JAGGED1*. Reakcija smjesa sastojala se od 1,5 µl 10x pufera Taq DNA Polymerase reaction buffer (Sigma-Aldrich), 0,3 µl $MgCl_2$ (25 mM; Applied Biosystems), 0,3 µl dNTP (10 mM; Sigma-Aldrich), 1µl DNA, 0,3 µl uzvodne početnice za promotor CMV (F: 5' CGTCAATGGGTGGACTATTT 3', 10 µM), 0,3 µl nizvodne početnice za *JAGGED1* (R: 5' TGGGGAACACTCACACTCAA 3', 10µM), 0,1 µl polimeraze Taq (Sigma-Aldrich), te je nadopunjena vodom do ukupnog volumena od 15 µl. Reakcija se odvijala prema programu u Tablici 2.

Tablica 2. Program lančane reakcije polimerazom pomoću polimeraze Taq

Temperatura	**Vrijeme**	**Broj ciklusa**
94 °C	5 min	1x
94 °C	30 s	**37x**
56 °C	30 s	
72 °C	1,75 min	
72 °C	7 min	1x

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

Izolirani su proteini iz transficiranih stanica A9, stanica A9 te stanica A1235. Stanice koje rastu u petrijevki isprane su ledeno hladnim puferom PBS (*phosphate buffered saline*; 137 mM NaCl, 2,7 mM

KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4) te su sastrugane strugačem. Smjesa je prebačena u mikroepruvetu, te su stanice skupljene u talog centrifugiranjem (5 minuta, 1500 rpm). Talog stanica resuspendiran je u 100 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), 100 µg/ml natrijev ortovanadat (Sigma-Aldrich)) i 1 µl inhibitora proteaza (Carl Roth). Smjesa se inkubirala 10 minuta na ledu, i zatim je smrznuta na tekućem dušiku. Uzorci su zatim centrifugirani 15 min na 12000 rpm pri 4 °C (Hettich ROTINA 420) i supernatant pohranjen na -80 °C.

Metoda za mjerenje koncentracije proteina Bradford temelji se na vezanju boje Coomasie briljant plavo (CBB, Carl Roth) za proteine u otopini pri kiselom pH, pri čemu dolazi do plavog obojenja. Mjerenjem apsorbancije na 500 nm indirektno možemo odrediti koncentraciju proteina. Baždarna krivulja napravljena je s albuminom goveđeg seruma (*Bovine serum albumin*, BSA; 10 µg/ml; New England Biolabs) u rasponu koncentracija od 0 do 10 µg po reakciji. U 10 µl razrjeđenja BSA dodano je 100 µl reagensa Bradford (100 mg CBB G-250, 50 ml 95% etanola, 100 ml 85% fosforne kiseline, dopuniti s deH_2O u ukupnom volumenu od 1 l) . Izolirani proteini razrijeđeni su 2x, te je uzeto po 10 µl razrijeđenog uzorka. U 10 µl uzorka dodano je 100 µl profiltriranog reagensa Bradford. Reakcija proteina s reagensom Bradford napravljena je u pločici s 96 bunarčića, a apsorbancija se mjerila pomoću uređaju Glomax (Promega).

2.5. Westernska metoda otiska

2.5.1. SDS-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Da bi se uzorci proteina analizirali metodom "western blot", prvo se razdvajaju gel-elektroforezom. U uzorke proteina dodan je odgovarajući volumen 6x pufera za nanošenje na gel (225 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glicerol, 2 mM SDS, 0.02% (w/v) bromfenol-plavo, 1% β-merkaptoetanol) (Laemmli, 1970). Smjesa je inkubirana 5 minuta na 95 °C kako bi se proteini denaturirali. Do denaturacije dolazi zbog izlaganja visokoj temperaturi i djelovanja β-merkaptoetanola, reducirajućeg agensa koji kida disulfidne veze unutar proteina. SDS u puferu za nanošenje na gel oblaže denaturirane proteine negativnim nabojem, i tako omogućava njihovo razdvajanje u električnom polju na temelju njihove molekulske mase.

Napravljen je poliakrilamidni gel koji se sastojao od 4%-tnog gela za sabijanje (gornji gel) i 10%-tnog gela za razdvajanje proteina (donji gel) (Tablica 3.). Glavna razlika između gelova je u postotku gela napravljenom od 30% (m/v) mješavine akrilamida (Acros Organics) i bisakrilamida (29:1 AA/Bis, Sigma-Aldrich). Za izlijevanje gela korišten je vertikalni sustav Biometra Eco-Mini (Biometra). Na polimerizirani gel za razdvajanje dodan je gel za sabijanje i umetnuti češljići za jažice. Nakon

polimerizacije gornjeg gela, gel je uronjen u sklopljenu aparaturu za vertikalnu gel-elektroforezu napunjenu puferom za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3). Na gel se nanosilo 5 µl proteinskog markera *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific), i po 25 µl pripremljenih uzoraka. Elektroforeza se odvijala 30 minuta na 140 V, dok uzorci nisu došli do gela za razdvajanje, a zatim još 1,5 sat na 180 V.

Tablica 3. Sastav poliakrilamidnog gela za razdvajanje proteina

	10 % gel	**4% gel**
deH_20	2,95 ml	4,1 ml
30% AA/Bis	2,5 ml	1 ml
1.5 M Tris-HCL (pH 8.8)	1.9 ml	-
1 M Tris-HCL (pH 6.8)	-	0,75 ml
10% SDS	75 µl	60 µl
10% APS	75 µl	60 µl
TEMED	5 µl	5 µl

2.5.2. Prijenos proteina na membranu

Nakon završetka elektroforeze proteini su se prenijeli na membranu od poliviniliden fluorida (PVDF; Roche). Membrana se prije prijenosa proteina aktivirala kratkim umakanjem u metanol. Kako bi se osigurao potpuni kontakt između gela i membrane, oni su se stavili u 'sendvič' od spužve i filter papira koji se učvrstio u kazeti za prijenos. Proteini na gelu su nabijeni negativnim nabojem, te se u električnom polju kreću od negativno nabijene katode prema pozitivno nabijenoj anodi. Stoga je prilikom slaganja 'sendviča' važno postaviti gel na stranu katode, a membranu na stranu anode. Prijenos proteina odvijao se u uređaju za prijenos proteina u električnom polju *Eco-Mini Tankblot* (Biometra). Kazeta za prijenos uronjena je u hladni pufer za prijenos (48 mM Tris-HCl, 39 mM glicin, 0.037% SDS, 20% metanol, pH 8.3). Prijenos se odvijao 2 sata uz stalnu jakost struje od 380 mA, uz miješanje na magnetskoj miješalici i pri temperaturi od 4 °C. Nakon prijenosa gel se obojao otopinom boje Coomasie briljant plavo R-250 (0.25 % (m/v) CBB R-250 u smjesi (v/v/v) 45% metanol : 10% octena kiselina : 45% deH_2O) kako bismo provjerili učinkovitost prijenosa.

Membrana je nakon prijenosa blokirana u 3%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u puferu TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20) kako bi se zasitila sva vezna mjesta na membrani i tako spriječilo nespecifično vezanje antitijela. Nakon blokiranja membrana je isprana u puferu TBST i inkubirana u primarnim antitijelima (Tablica 3.). Otopina primarnih antitijela smjesa je

preporučenog razrjeđenja primarnih antitijela u puferu TBST uz 0,5% nemasnog mlijeka. Inkubacija se odvijala preko noći na 4 °C uz miješanje na miješalici. Membrana je nakon inkubacije ispirana 3 puta po 15 minuta u puferu TBST. Membrana se zatim inkubira 1 sat u otopini sekundarnih antitijela konjugiranih s enzimom peroksidazom hrena. Sekundarna antitijela (Tablica 4.) pripremljena su u razrjeđenju 1:5000 u puferu TBST uz 0,5% nemasnog mlijeka. Nakon inkubacije membrana je isprana 3 puta po 15 minuta u puferu TBST.

S membrane od poliviniliden fluorida mogu se ukloniti već vezana antitijela, pa je moguća detekcija nekoliko različitih proteina. Membrana je nakon imunodetekcije prvog proteina od interesa isprana 2 puta po 10 minuta u blagom puferu za uklanjanje vezanog antitijela (7,5 g glicin, 0,5 g SDS, 5 ml Tween 20, nadopuniti do 500 ml s deH_2O (pH=2,2)), te 2 puta po 10 minuta u PBS-u i puferu TBST. Tako je pripremljena za vezanje primarnih antitijela za drugi protein od interesa.

Tablica 3. Popis korištenih primarnih antitijela

Antigen	**Porijeklo**	**Razrjeđenje**	**Proizvođač**
JAGGED1	koza	1:750	Santa Cruz Biotechnology
β-AKTIN	miš	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
DLL1	miš	1:200 * 1% mlijeko	Cell Signaling

Tablica 4. Popis korištenih sekundarnih antitijela

Antitijelo	**Porijeklo**	**Razrjeđenje**	**Proizvođač**
protukozje	zec	1:5000	Sigma-Aldrich
protumišje	koza	1:5000	Sigma-Aldrich

2.5.3. Imunodetekcija proteina na membrani

Za detekciju proteina na membrani zaslužna je peroksidaza hrena konjugirana sa sekundarnim antitijelima. Na membranu se dodao komercijalni kemiluminiscentni supstrat *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) i inkubirao 2-3 minute. U prisustvu peroksidaze hrena dolazi do oksidacije supstrata i nastanka međuprodukta koji otpušta svjetlo. Kako bismo detektirali kemiluminiscencijsku

reakciju, membrana je u tamnoj komori omotana prozirnom folijom i na nju se položio rendgenski film Super HR-U30 (Fujifilm, Japan), te su se oboje uklopili u kazetu za razvijanje. Nakon nekoliko minuta, film se izvadio iz kazete i razvio kratkim umakanjem u razvijač (Sigma-Aldrich). Kako bi se zaustavila reakcija na filmu, film se zatim isprao u destiliranoj vodi, fiksiru (Efke Fotokemika) i još jednom u destiliranoj vodi. Nakon sušenja, filmovi su skenirani i obrađeni u računalnom programu ImageJ (U.S. National Institutes of Health).

2.6. Uzgoj stanica u kokulturi

Da bi se istražio biološki učinak liganda JAGGED1 na stanične linije leukemijskih B-limfocita, 697 i Nalm6, ove suspenzijske stanice uzgajale su se u kokulturi sa stanicama koje ga eksprimiraju. Metodom "western blot" utvrđeno je da adherentna stanična linija ljudskog glioblastoma A1235 eksprimira JAGGED1, te su stanice te linije odabrane kao stanice hranilice za kokulturu .

Nekoliko dana prije početka eksperimenta stanice stanične linije A1235, koje inače rastu u mediju DMEM s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma, presađene su u medij RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (Sigma-Aldrich) kako bi se prilagodile. Nulti dan eksperimenta stanice linije A1235 nasađene su kao stanice hranilice u petrijeve zdjelice promjera 35 mm, oko $1x10^5$ stanica po petrijevki, u medij RPMI sa serumom. Inkubirale su se 2 sata kako bi se prihvatile za podlogu. Prihvaćenim je stanicama odsisan medij, te je na njih dodano 1,5 ml stanica stanične linije Nalm6, odnosno 697 u mediju RPMI. Za uspješan daljnji rast suspenzijskih stanica potrebno je u jednu petrijevku nasaditi oko $2x10^5$ stanica linije Nalm6, odnosno $5x10^5$ stanica/ml linije 697. Usporedno se nasađuju isti volumeni suspenzijskih stanica u petrijeve zdjelice bez stanica linije A1235, koje služe kao kontrola. Po jedan od duplikata kokultura i samih suspenzijskih stanica tretiran je inhibitorom gama sekretaze, DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicin t-butil ester; 20 μM; Sigma-Aldrich). DAPT se dodaje kao inhibitor aktivacije signalnog puta Notch, kako bi se moglo zaključiti je li utjecaj ligand JAGGED1 na proliferaciju limfocita posljedica aktivacije puta Notch.

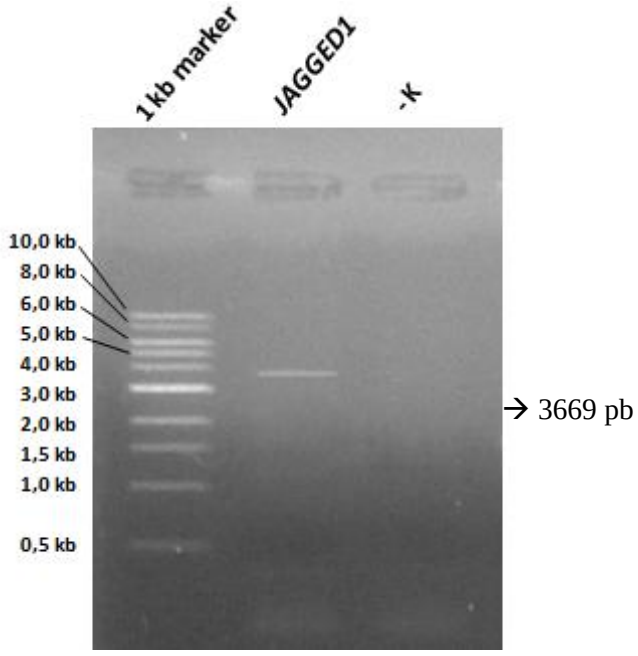
Svaki drugi dan suspenzijske se stanice prebrojane. Stanice su resuspendirane i sakupljene u novu mikroepruvetu, uz izjednačavanje volumena na 1,5 ml novim medijem RPMI. Za nastavak eksperimenta nasađena je trećina volumena stanica (0,5 ml) u 1 ml novog medija RPMI na nove stanice hranilice i uz dodatak DAPT-a. Uzet je alikvot stanica za brojanje od 50 μl i pomiješan s istim volumenom tripanskog modrila (Gibco). Žive i mrtve stanice prebrojane su hemocitometrom, u Bürkerovoj komorici. Nakon 7-10 dana brojenja podaci o proliferaciji i vijabilnosti stanica obrađeni u računalnom programu Microsoft Excel.

3. REZULTATI

U prvom dijelu eksperimenta u diplomskom radu konstruiran je plazmid pcDNA3-JAGGED1 koji sadrži kodirajuću sekvenciju za ligand JAGGED1, protein s bitnom ulogom u signalnom putu Notch. U drugom dijelu istraživanja dobiveni je plazmid unesen u stanice mišjih fibroblasta stanične linije A9 u pokušaju da se dobije adherentna stanična linija sa stabilnom ekspresijom liganda JAGGED1. Treći dio eksperimenta fokusirao se na praćenje proliferacije limfocita u kokulturi sa stanicama koje imaju eksprimiran ligand JAGGED1.

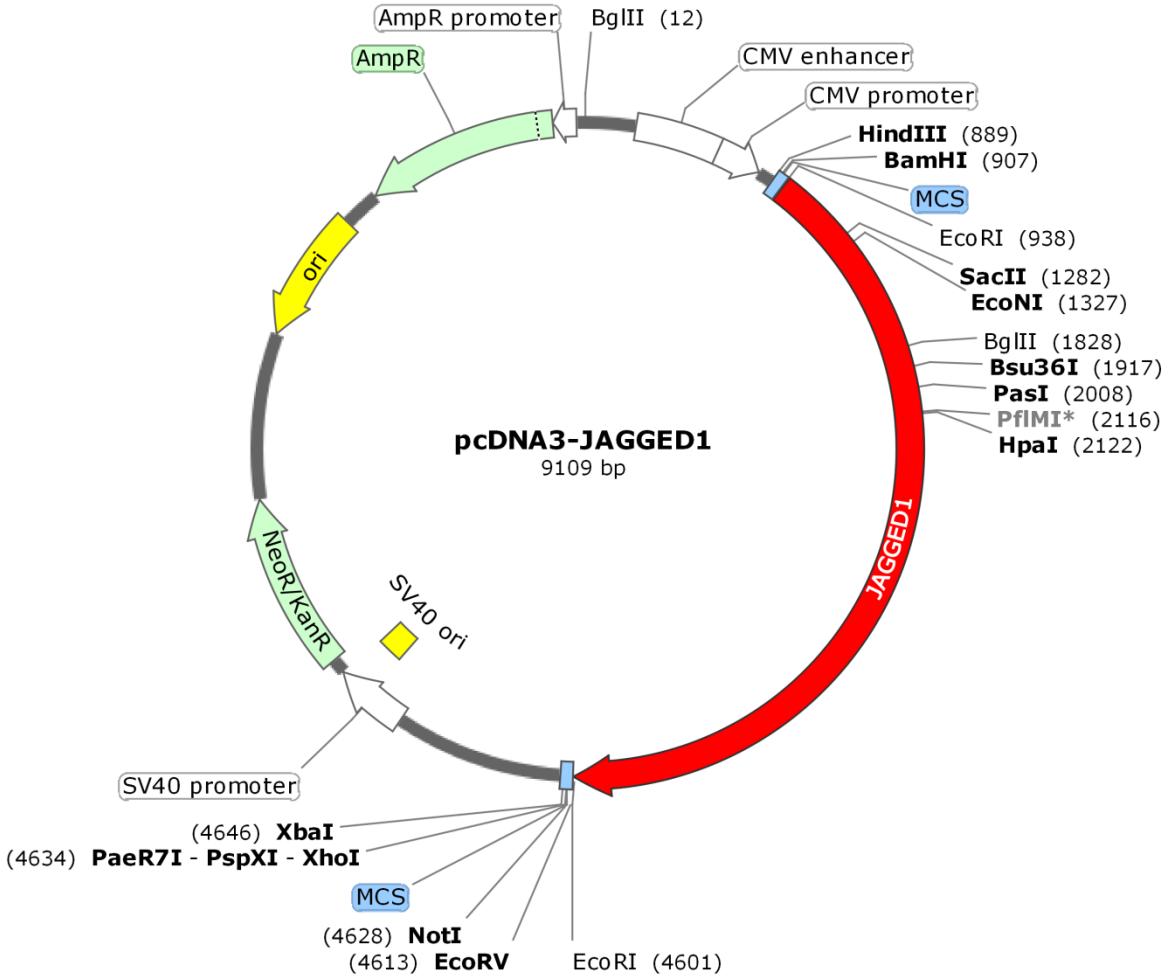
3.1. Konstrukcija plazmida

Plazmid pcDNA3-JAGGED1 konstruiran je tako da je u sekvencija gena *JAGGED1* ugrađena u plazmid pcDNA3. Prvo su konstruirane početnice pomoću kojih je umnožena sekvencija gena iz cDNA dobivene transkripcijom humane RNA. Kvaliteta dizajna početnica za kloniranje gena *JAGGED1* provjerena je programom AmplifX. Provjereno je da ne stvaraju homodimere i heterodimere. Koristeći navedeni program za *in silico* lančanu reakciju polimerazom, provjerena je veličina produkta koji bi se trebao dobiti u stvarnim reakcijskim uvjetima. Predviđeni amplikon uključuje čitavu kodirajuću sekvenciju gena *JAGGED1* veličine 3657 pb (Prilog 1.), uz dodatak sekvencije koja je podložna cijepanju restrikcijskim enzimom *EcoRI* na početku i kraju sekvencije. Lančanom reakcijom polimerazom Q5 dobiven je produkt veličine 3669 pb (Slika 6.)



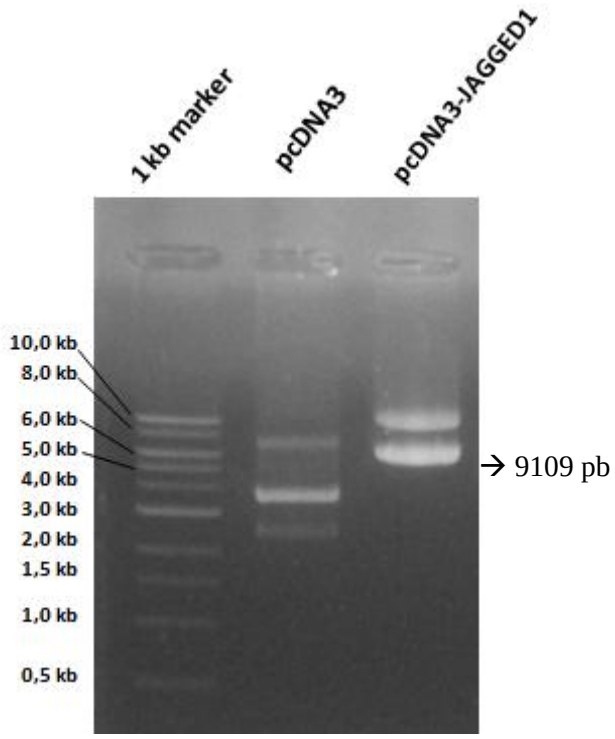
Slika 6. Produkt lančane reakcije polimerazom Q5 vizualiziran na 1% agaroznom gelu. 1 kb marker: standard veličine DNA; *JAGGED1*: umnožena sekvencija gena *JAGGED1* iz cDNA; -K: kontrolna reakcija PCR bez dodanog kalupa.

Umnoženi fragment Jagged1 pročišćen je iz agaroznog gela u koncentraciji od 11 µg/ml. Pročišćeni insert od interesa i linearizirani plazmid pcDNA3 ligirani su zajedno dajući plazmid pcDNA3-JAGGED1 (Slika 7.). Fragment Jagged1 ugrađen je u plazmid na mjestu cijepanja restrikcijskog enzima EcoRI.



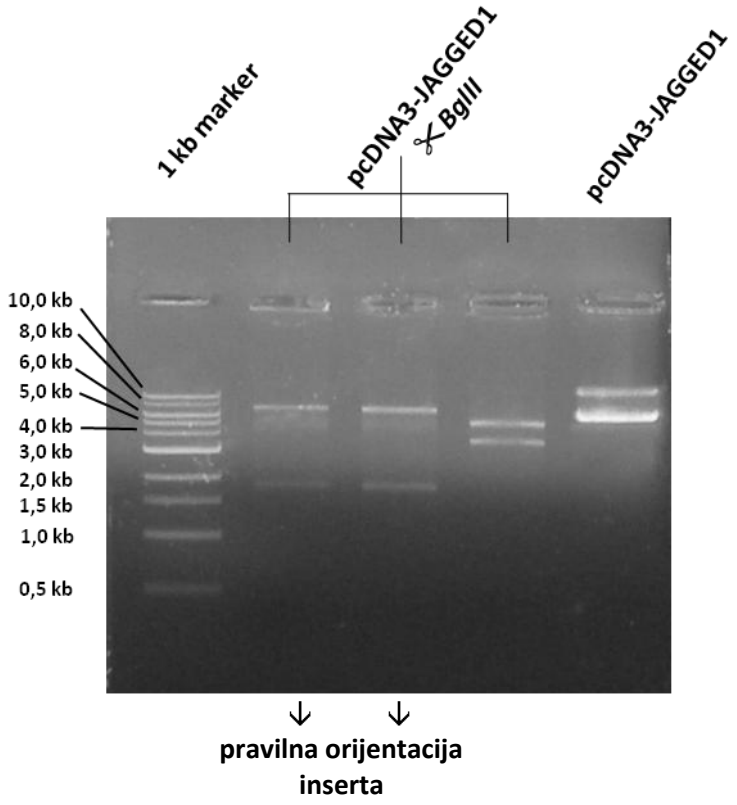
Slika 7. Mapa plazmida pcDNA3-JAGGED1 napravljena u programu *Snapgene* (verzija 4.2.11., GSL Biotech).

Dobiveni plazmid umnožen je i vizualiziran na gelu agaroze. Cirkularni plazmidi postoje u nekoliko superzavijenih oblika. Stoga nakon elektroforeze cirkularnih plazmida na gelu ne vidimo samo jednu vrpcu, već njih nekoliko. Također, zbog različite superzavijenosti vrpce plazmidne DNA ne moraju veličinom odgovarati pravoj veličini plazmida. Iz toga razloga, za provjeru veličine izoliranog plazmida koristili smo usporedbu s praznim cirkularnim plazmidom pcDNA3 (Slika 8.).



Slika 8. Plazmid pcDNA3-JAGGED1 vizualiziran na 0,8% agaroznom gelu. 1 kb marker: standard veličine DNA; pcDNA3: plazmid; pcDNA3-JAGGED1: plazmid s ugrađenom sekvencijom *JAGGED1*.

Kako je insert na 5'- i na 3'- kraju imao dodano isto restrikcijsko mjesto, orijentacija inserta u plazmidu pcDNA3-JAGGED1 bila je nasumična. Plazmid je stoga pocijepan restrikcijskim enzimom koji ga cijepa na dva mjesta, enzimom *BglII*. Duljine fragmenata dobivenih nakon digestije ovim restrikcijskim enzimom ovisne su o orijentaciji inserta Jagged1. Ako je insert u pravilnoj orijentaciji, digestija enzimom *BglII* daje odsječke duljine 7293 pb i 1816 pb. Ako je insert u krivoj orijentaciji, odsječci su dugački 5410 pb i 3699 pb. (Slika 9.). Nakon elektroforeze utvrđen je plazmid s pravilnom orijentacijom. Orijentacija plazmida potvrđena je sekvenciranjem (Macrogen).

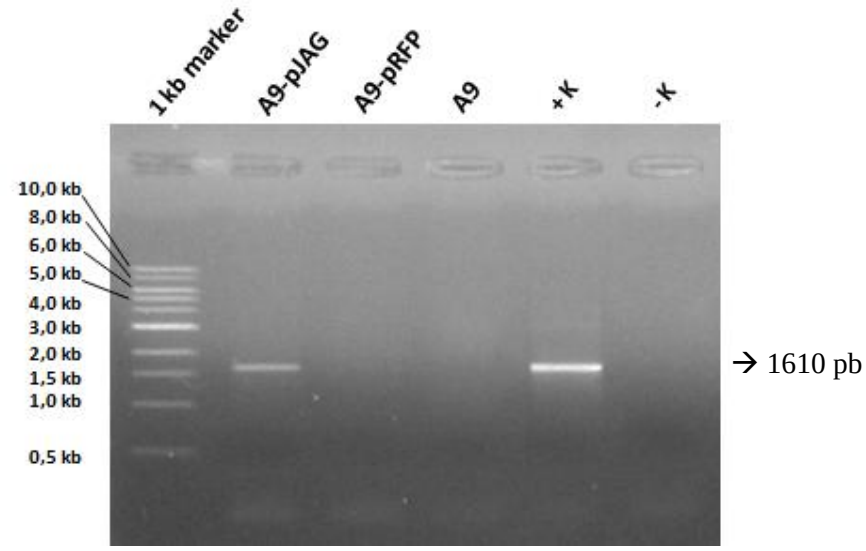


Slika 9. Analiza orijentacije ugradnje fragmenta *JAGGED1* u plazmid pcDNA3. Plazmidi dobiveni iz različitih kolonija cijepani su restrikcijskim enzimom *BglII* i analizirani gel elektroforezom. 1 kb marker: standard veličine DNA; pcDNA3-JAGGED1 ✂ *BglII*: plazmidi izolirani iz različitih kolonija pocijepani restrikcijskim enzimom *BglII*; pcDNA3: nepocijepani plazmid.

3.2. Ekspresija gena *JAGGED1* u stanicama mišjih fibroblasta A9

Stanice mišjih fibroblasta stanične linije A9 transficirane su plazmidom pcDNA3-JAGGED1. 48 sati nakon transfekcije stanicama je dodan antibiotik geneticin. Stanice su pod selekcijom bile 14 dana, a tada su presađene i dalje uzgajane kao klonalne linije.

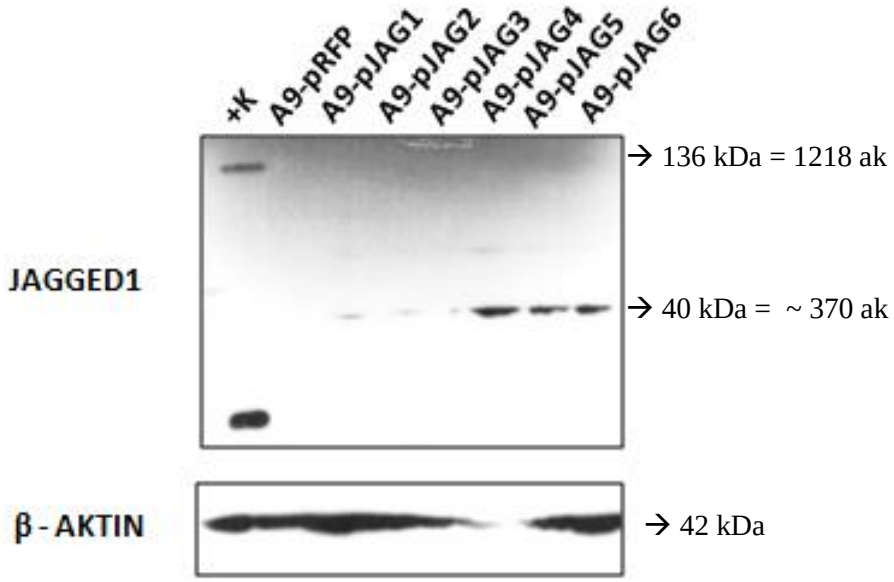
Kako bismo dokazali da uzgojene stanice sadrže željeni plazmid i nakon selekcije, iz stanica je izolirana DNA i korištena kao kalup za lančanu reakciju polimerazom. Za reakciju je kao uzvodna početnica korištena početnica za promotor CMV, a nizvodna početnica za gen *JAGGED1*. Dobiven je amplikon veličine 1610 pb. Kako bismo bili sigurni da je umnažanje tog amplikona jedinstveno za stanice koje sadrže plazmid pcDNA3-JAGGED1, napravljene su kontrolne reakcije. One su kao kalup imale DNA izoliranu iz stanica A9 transfeciranih s plazmidom pcDNA-RFP, te DNA iz stanica A9. U ovim reakcijama nije došlo do umnožavanja ciljne sekvencije. Za pozitivnu kontrolu kao kalup je iskorišten plazmid pcDNA-JAGGED1. Produkti ovih reakcija analizirani su gel elektroforezom (Slika 10.).



Slika 10. Provjera prisutnosti plazmida pcDNA3-JAGGED1 u transficiranim klonovima stanica A9. DNA izolirana iz stanica umnožena je pomoću početnica specifičnih za plazmid pcDNA3-JAGGED1 i analizirana gel elektroforezom. 1 kb marker: standard veličine DNA; A9-pJAG: produkt reakcije PCR koja kao kalup koristi DNA iz stanica A9 transficiranih plazmidom pcDNA3-JAGGED1; A9-pRFP: produkt kontrolne reakcije PCR koja kao kalup koristi DNA iz stanica A9 transficiranih plazmidom pcDNA3-RFP; A9: produkt kontrolne reakcije PCR koja kao kalup koristi DNA iz stanica A9; +K: pozitivna kontrola reakcije PCR; -K: negativna kontrola reakcije PCR bez dodanog kalupa.

3.2.1. Analiza ekspresije proteina JAGGED1 u stanicama mišjih fibroblasta A9 metodom ''western blot''

Iz uzgojenih stanica mišjih fibroblasta izolirani su proteini, te im je određena koncentracija. Proteini su analizirani metodom "western blot". Osim proteina od interesa JAGGED1, na membrani je detektiran i protein β-aktin kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani na Slici 11.



Slika 11. Protein JAGGED1 eksprimiran u stanicama mišjih fibroblasta linije A9 analiziran metodom "western blot". Nakon transfekcije stanica A9 plazmidom pcDNA3-JAGGED1 iz pojedinih su kolonija izolirani proteini te analizirani metodom "western blot" pomoću antitijela na protein JAGGED1 i beta aktin. +K: pozitivna kontrola; A9-pRFP: proteini iz stanica A9 transficiranih plazmidom pcDNA3-RFP, negativna kontrola; A9-pJAG1-6: proteini iz stanica A9 transficiranih plazmidom pcDNA3-JAGGED1, izolirani iz 6 različitih kolonija. ak: aminokiselina.

Kao pozitivna kontrola korišteni su proteini izolirani iz stanične linije Jurkat. Kod pozitivne kontrole vidljiv je signal specifičan za JAGGED1. Taj signal odgovara proteinu molekulske mase od 136 kDa, što je teorijska masa proteina JAGGED1. Signal proteina male molekulske mase koji se javlja kod pozitivne kontrole potječe od degradiranih liganda JAGGED. Proteini iz stanične linije A9 transficirane plazmidom pcDNA3-RFP korišteni su kao negativna kontrola. Svi uzorci proteina stanične linije A9 transficirane plazmidom pcDNA3-JAGGED1 imaju signal proteina JAGGED1, ali signal ne odgovara signalu pozitivne kontrole. Signal odgovara proteinu niže molekulske mase od 40 kDa. To znači da uzgojene stanice A9 s plazmidom pcDNA3-JAGGED1 ne eksprimiraju cijeli protein JAGGED1, već samo njegovu skraćenu varijantu. Pretpostavili smo da je prilikom umnažanja gena JAGGED1 došlo do točkaste mutacije *nonsense* tipa, te nastanka preuranjenog stop kodona.

3.2.2. Računalna obrada sekvencije plazmida pcDNA3-JAGGED1

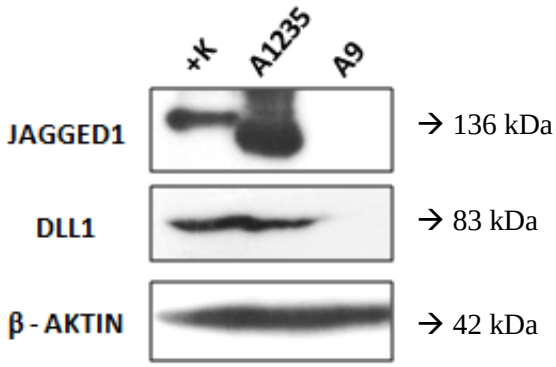
Plazmid je poslan na sekvenciranje (Macrogen). Provjerili smo dobivene rezultate sekvenciranja kako bismo potvrdili da se zaista radi o preuranjenom stop kodonu koji rezultira ekspresijom skraćenog proteina. Sekvencija plazmida prevedena je u aminokiseline pomoću programa *Translate* (ExPASy), i dobiven sljedeći protein:

M R S P R T R G R S G R P L S L L L A L L C A L R A K V C G A S G Q F E L E I L S M Q N V N G E L Q N G N C C G G A R N P G D R K C T R D E C D T Y F K V C L K E Y Q S R V T A G G P C S F G S G S T P V I G G N T F N L K A S R G N D R N R I V L P F S F A W P R S Y T L L V E A W D S S N D T V Q P D S I I E K A S H S G M I N P S R Q W Q T L K Q N T G V A H F E Y Q I R V T C D D Y Y Y G F G C N K F C R P R D D F F G H Y A C D Q N G N K T C M E G W M G P E C N R A I C R Q G C S P K H G S C K L P G D C R C Q Y G W Q G L Y C D K C I P H P G C V H G I C N E P W Q C L C E T N W G G Q L C D K D L N Y C G T H Q P C L N G G T C S N T G P D K Y Q C S C P E G Y S G P N C E I A E H A C L L D P C P N K G S C K E T S L G L Stop.

Ako je prosječna masa jedne aminokiseline 0.11 kDa, približna masa ovog proteina bila bi 39.4 kDa, što odgovara masi proteina koji smo detektirali metodom "western blot". Točna masa ovog proteina izračunata je u programu *Compute pI/Mw* (ExPASy), i iznosi 39.41 kDa. Protein eksprimiran s konstruiranog plazmida pcDNA3-JAGGED1 odgovara N-terminalnom, ekstracelularnom dijelu liganda JAGGED1 (provjereno u bazi UniProt (The UniProt Consortium, 2018)). Nedostaje mu veći dio ekstracelularne domene, transmembranska regija i intracelularna domena. Ovakav krnji protein ipak sadrži domenu DSL i dio EGF-sličnih ponavljanja bitnih za interakciju s receptorom Notch. No, za aktivaciju receptora potrebna sila povlačenja koja je nemoguća bez liganda usidrenog za membranu (Kovall i sur., 2018).

3.3. Analiza ekspresije proteina JAGGED1 u stanicama glioblastoma A1235 metodom ''western blot''

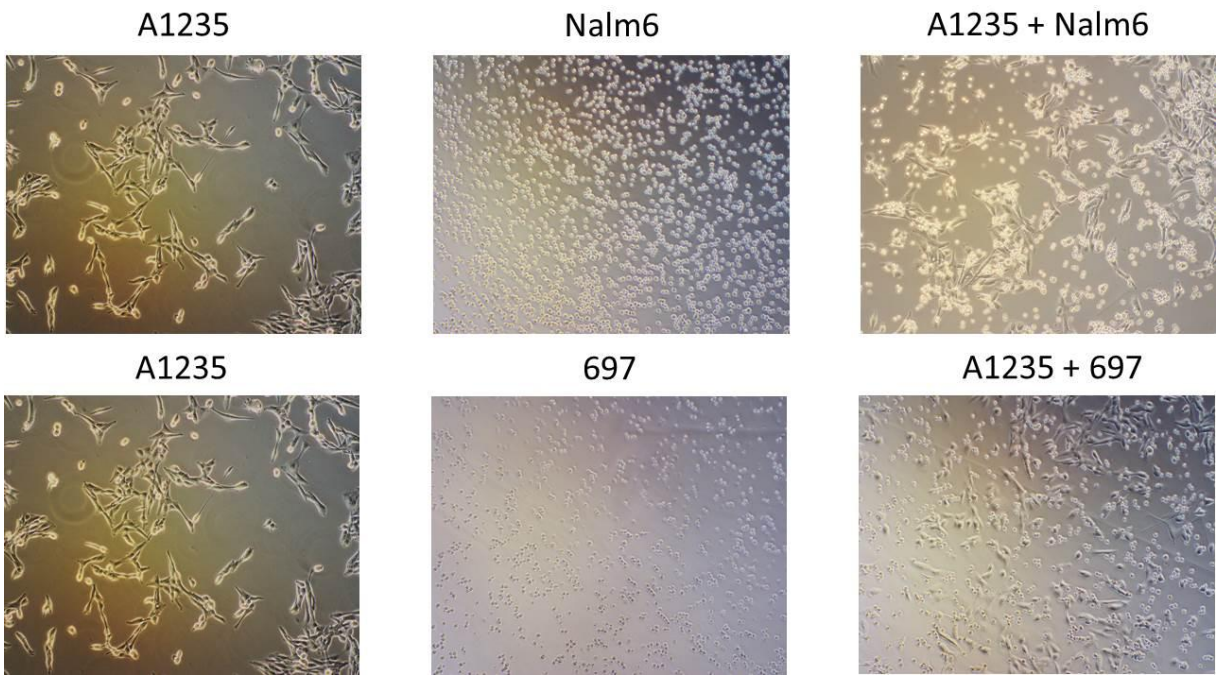
Kako nismo uspjeli eksprimirati cjeloviti protein JAGGED1 u adherentnoj staničnoj kulturi, morali smo pronaći drugu staničnu liniju koju bismo koristili kao stanice hranilice za kokulturu s limfocitima. Metodom "western blot" utvrdili smo da stanična linija A1235, adherentna stanična linija ljudskog glioblastoma, ima eksprimiran JAGGED1 (Slika 12.). Pokazali smo da stanice A1235 imaju eksprimiran i protein DLL1, protein iz druge skupine liganada receptora Notch. Kao pozitivna kontrola korišteni su proteini izolirani iz stanične linije Jurkat, a kao negativna kontrola proteini iz stanične linije mišjih fibroblasta A9.



Slika 12. Analiza proteina JAGGED1 i DLL1 eksprimiranih u stanicama glioblastoma linije A1235. Iz stanica A9 i A1235 izolirani su proteini i analizirani metodom "western blot" pomoću antitijela na proteine JAGGED1 i DLL1. +K: pozitivna kontrola; A1235: proteini iz stanica A1235; A9: proteini iz stanica A9.

3.4. Proliferacija limfocita u kokulturi sa stanicama glioblastoma A1235

Da bi se istražio biološki učinak liganda JAGGED1 na stanične linije leukemijskih B-limfocita, 697 i Nalm6, ove suspenzijske stanice uzgajale su se u kokulturi sa stanicama glioblastoma linije A1235 (Slika 13.). Stanična proliferacija pratila se brojanjem stanica obojanih tripanskim modrilom hemocitometrom kroz najmanje 7 dana. Usporedno su uzgajane kontrolne stanice B-limfocita bez glioblastomskih stanica u kokulturi, te se pratila i njihova proliferacija. Stanice u kokulturi i kontrolne stanice nasađene su u duplikatima, te je jedna skupina tretirana spojem DAPT (20 μM), inhibitorom γ-sekretaze, svaki drugi dan. DAPT inhibira aktivaciju signalnog puta Notch. Dobiveni podaci obrađeni su u programu Microsoft Excel, te su dobivene krivulje rasta i krivulje preživljenja.

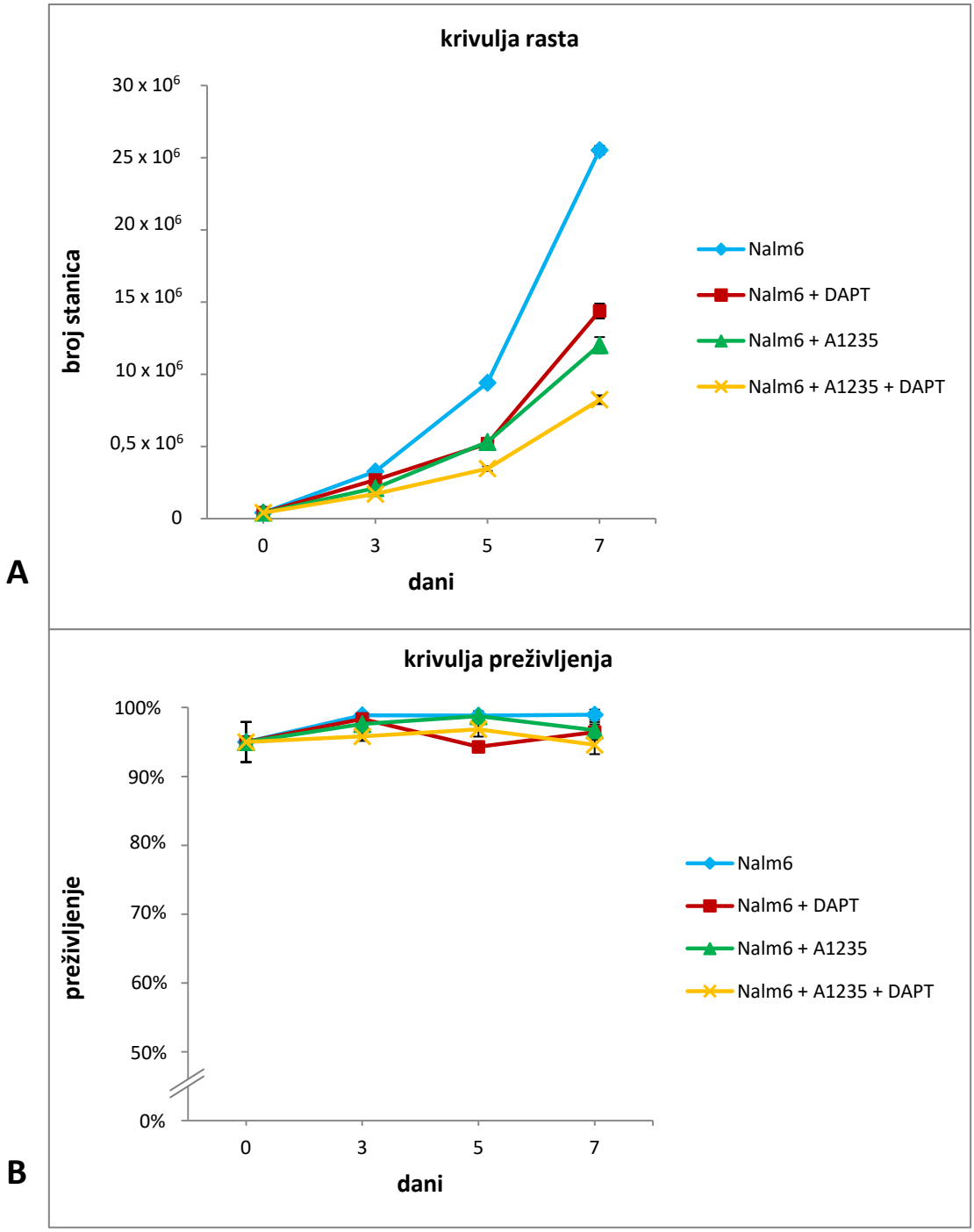


Slika 13. Stanice A1235, limfociti Nalm6 i 697 u staničnoj kulturi. A1235: stanice A1235 uzgajane kao monokultura; Nalm6: stanice Nalm6 uzgajane kao monokultura; A1235 + Nalm6: stanice Nalm6 u kokulturi sa stanicama A1235; 697: stanice 697 uzgajane kao monokultura; A1235 + 697: stanice 697 u kokulturi sa stanicama A1235.

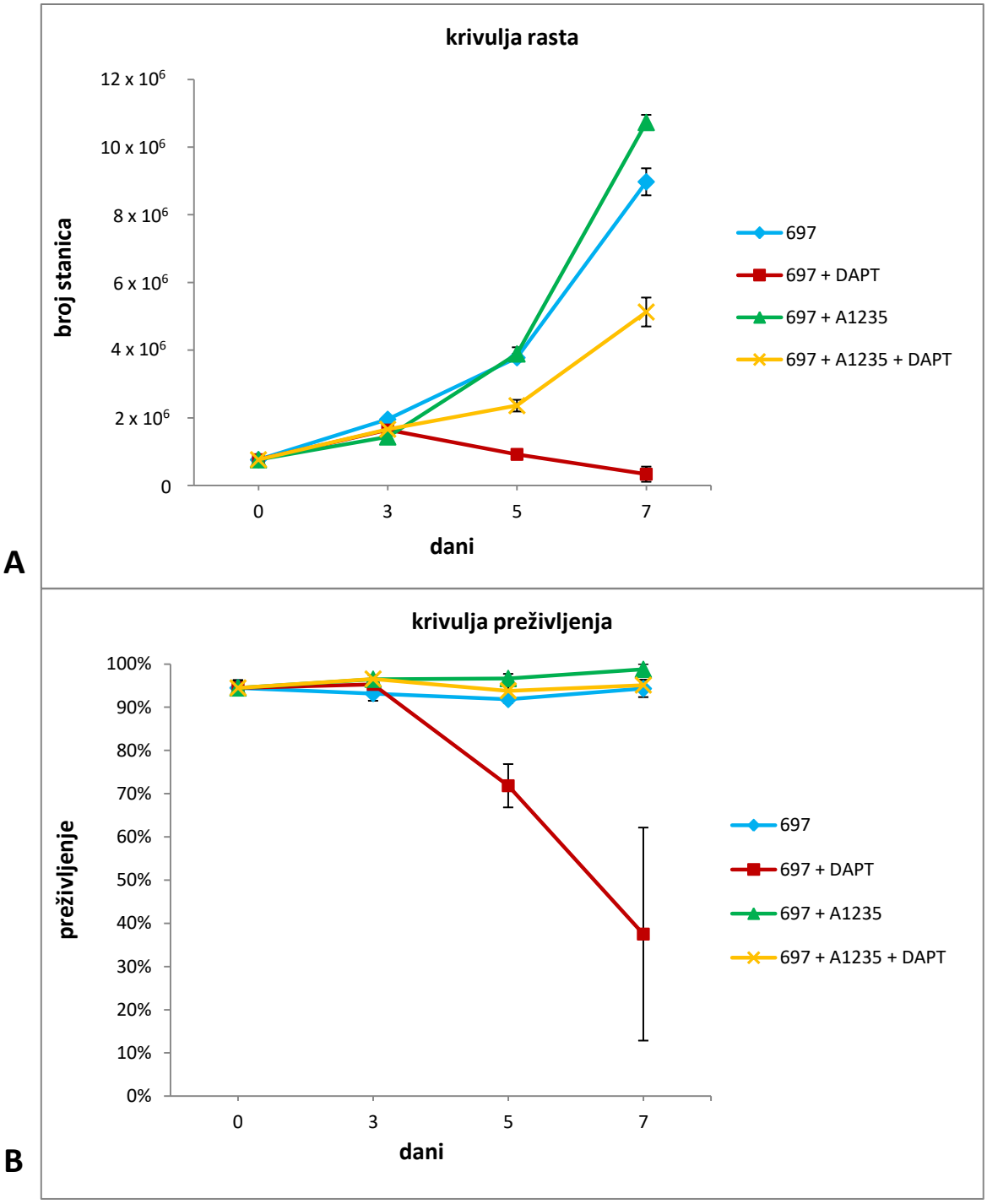
Rezultati brojanja stanica prikazani su na Slikama 14. i 15. Stanice Nalm6 u kokulturi sa stanicama A1235 rasle su nešto sporije od kontrolnih stanica, te je 7. dana (na kraju eksperimenta) broj stanica Nalm6 uzgajanih u kokulturi iznosio 47% u odnosu na kontrolu. Dodatak DAPT-a usporio je proliferaciju kontrolnih limfocita, tako da je broj stanica bio 56% u odnosu na kontrolne netretirane stanice, i nešto slabije proliferaciju limfocita u kokulturi, tako da je broj stanica bio 68% u odnosu na netretirane stanice uzgajane u kokulturi. Efekt tretmana DAPT-om postaje vidljiv tek nakon 5 dana. Tijekom cijelog eksperiment nije došlo do većeg umiranja stanica (Slika 14).

Stanice linije 697 u kokulturi sa stanicama A1235 rasle su slično kontrolnim stanicama tijekom prvih 5 dana eksperimenta, ali su ih do posljednjeg dana pretekle, te je 7. dana ukupni broj stanica 697 uzgajanih u kokulturi iznosio 119% u odnosu na kontrolu. Tretman DAPT-om vidljivo je usporio rast limfocita u kokulturi, te je broj stanica bio 48% u odnosu na netretirane stanice uzgajane u kokulturi. DAPT je usporio i kontrolnu skupine stanica, tako da je 7. dana broj kontrolnih stanica 697 tretiranih DAPT-om iznosio samo 4% u odnosu na kontrolne netretirane stanice. Efekt tretmana na staničnu liniju 697 vidljiv je već nakon 3 dana. Sam eksperiment ponovljen je nekoliko puta, te je utvrđeno da stanična linija 697 u kulturi uspješno proliferira samo ako je nasađena u optimalnoj koncentraciji. Limfociti koji su rasli bez stanica hranilica počeli su umirati kada bi im koncentracija bila premala. To

se dogodilo i kod kontrolnih stanica tretiranih DAPT-om. Kod ostalih kultura nije došlo do značajnog umiranja stanica u tijeku eksperimenta (Slika 15).



Slika 14. Krivulje rasta i preživljenja limfocita stanične linije Nalm6 u kokulturi s adherentnim stanicama stanične linije A1235. A: Krivulja rasta. Stanice su uzgajane kroz 7 dana i brojane svaki drugi dan. B: Krivulja preživljenja. Stanice su obojene tripanskim modrilom i praćen je broj živih stanica kroz 7 dana uzgoja. Nalm6: stanice uzgajane kao monokultura; Nalm6 + DAPT: stanice u monokulturi obrađene s 20 μM DAPT; Nalm6 + A1235: stanice uzgajane u kokulturi; Nalm6 + A1235 + DAPT: stanice u kokulturi obrađene s 20 μM DAPT.



Slika 15. Krivulje rasta i preživljenja limfocita stanične linije 697 u kokulturi sa adherentnim stanicama stanične linije A1235. A: Krivulja rasta. Stanice su uzgajane kroz 7 dana i brojane svaki drugi dan. B: Krivulja preživljenja. Stanice su obojene tripanskim modrilom i praćen je broj živih stanica kroz 7 dana uzgoja. 697: stanice uzgajane kao monokultura; 697 + DAPT: stanice u monokulturi obrađene s 20 μM DAPT; 697 + A1235: stanice uzgajane u kokulturi; 697 + A1235 + DAPT: stanice u kokulturi obrađene s 20 μM DAPT.

4. RASPRAVA

Signalni put Notch jedan je od glavnih signalnih putova koji reguliraju diferencijaciju krvnih stanica. Istraživanja su pokazala da je ovaj signalni put ključan za usmjeravanje limfocita prema T- i B-linijama. Naime, aktivacija signalnog puta Notch potrebna je za induciranje razvoja T-limfocita iz limfoidnih progenitora, dok njegova aktivnost istovremeno sprječava aktivaciju signalnih putova koji uzrokuju diferencijaciju limfoidnih progenitora u B-limfocite (Taghon i sur., 2005).

U ovome se radu pokušalo utvrditi hoće li aktivacija signalnog puta Notch ligandom JAGGED1 imati utjecaj na proliferaciju B-limfocita u staničnoj kulturi. U doktorskom je radu (Horvat, 2018) istražen utjecaj aktivacije signalnog puta Notch ligandom "Delta-like" na stanice 697, pa smo stoga odabrali drugi ligand, JAGGED1, za indukciju signalizacije. Prvo smo konstruirali eukariotski ekspresijski plazmid s ugrađenom sekvencijom koja kodira protein JAGGED1. Nakon transfekcije stanica mišjih fibroblasta A9 detektiran je međutim okrnjeni protein. Kako stanice A9 ne eksprimiraju taj protein, detektirani protein JAGGED1 bio je eksprimiran s unesenog plazmida; no, imao je manju molekulsku masu. Analiza sekvencije pokazala je da sadrži preuranjeni stop kodon uzrokovan točkastom mutacijom *nonsense* tipa. Stoga je uloga signaliziranja putem JAGGED1 istražena praćenjem staničnih linija Nalm6 i 697 u kokulturi sa stanicama glioblastoma A1235 koje eksprimiraju ovaj ligand.

Jedna skupina stanica uzgajanih u kokulturi i jedna skupina kontrolnih stanica tretirane su spojem DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicin t-butil ester). DAPT je inhibitor γ-sekretaze, proteolitičkog enzima koji spada u skupinu intramembranskih proteaza (poznatih i pod kraticom *i-CLiP*), a zaslužan je za cijepanje receptora Notch na mjestu S3. Cijepanjem receptora Notch γ-sekretazom dolazi do oslobađanja intracelularne domene receptora i aktivacije signalizacije. Inhibirajući γ-sekretazu, DAPT blokira aktivaciju signalnog puta Notch (Crawford i Roelink, 2007; Liu i sur., 2014). γ-sekretaza je enzim s vrlo velikim brojem supstrata, kojima je zajedničko da su transmembranski proteini tipa 1 s ulogom u raznim signalnim putevima kojima reguliraju procese bitne za život stanice (Haapasalo i Kovacs, 2011; Zhang i sur., 2014). Neki od supstrata γ-sekretaze osim receptora i liganada signalnog puta Notch su β-amiloidni prekursorski protein (APP), E-kadherin, receptorska tirozin kinaza ErbB4, površinski antigen CD44 i enzim tirozinaza. Dodatkom DAPT-a isključuje se potencijalan utjecaj drugih signala kojim stanice hranilice induciraju promatrane limfocite. To nam omogućuje da vidimo je li efekt na proliferaciju limfocita zaista posljedica aktivacije signalnog puta Notch.

Stanične linije 697 i Nalm6 porijeklom su prekursori B-limfocita. Karakteriziraju se kao akutne limfoblastične leukemije (B-ALL). Eksprimiraju gene koji su biljezi diferencijacije limfocita - obje stanične linije eksprimiraju gen *PAX5*, a linija Nalm6 eksprimira i gen *PU.1*. (Horvat, 2018).

Ekspresija receptora i liganada signalnog puta Notch u ovim staničnim linijama analizirana je na razini gena. Stanice Nalm6 i stanice 697 eksprimiraju receptore Notch1, Notch2, Notch3 (Horvat, 2018) i Notch4 (Zweidler-McKay i sur., 2005). Stanice 697 imaju eksprimiran i ligand JAGGED1 (Horvat, 2018). Signalni put Notch u ovim staničnim linijama nije aktivan. To je potvrđeno analizom ekspresije nizvodnih gena signalnog puta Notch (Horvat, 2018; Horvat i sur., 2018). Pokazano je da stanice Nalm6 i 697 nemaju ekspresiju proteina HES1 i HEY1 koji su nizvodne mete puta Notch. Utvrđena je ekspresija gena *Runx1* i *Numb*, koji su negativni regulatori signalnog puta Notch (Pece i sur., 2011; Li i sur., 2018). Također, na razini proteina nije detektirana prisutnost NICD, domene koja nastaje vezanjem liganda i cijepanjem receptora Notch, a u jezgri sudjeluje u aktivaciji transkripcije ovisne o ovom signalnom putu.

Kod stanica Nalm6 u kokulturi sa stanicama A1235 došlo je do smanjenja proliferacije od 57% u odnosu na kontrolne stanice. Proliferacija kontrolnih stanica dodatkom DAPT-a se usporila za 44% u odnosu na netretiranu kontrolu. Slično se dogodilo i sa tretiranim stanicama u kokulturi, te su rasle 32% sporije od svoje netretirane replike. Budući da stanice Nalm6 nemaju aktivan put Notch, inhibicija γ-sekretaze nije mogla utjecati na inhibiciju aktivacije puta Notch kod kontrolnih stanica. Međutim, DAPT sprječava cijepanje i ostalih supstrata γ-sekretaze. Vjerojatno je DAPT inhibicijom γ-sekretaze inhibirao i neke signalne putove neovisne o putu Notch i uzrokovao usporen rast kontrolnih stanica. Rast u kokulturi usporio je rast stanica Nalm6. Moguće je da je do pada u proliferaciji stanica došlo preko djelovanja drugih signalnih putova, od otopljenih faktora rasta koje luče stanice A1235 do potencijalnih liganada drugih signalnih putova. No, pretpostavljamo da nije došlo do aktivacije signalnog puta Notch. Da je put Notch aktiviran, tretman stanica s DAPT-om vratio bi proliferaciju do razine rasta kontrolnih stanica u monokulturi, što se nije dogodilo.

Stanice 697 u kokulturi sa stanicama A1235 imale su sličnu proliferaciju kao i kontrolne stanice. DAPT je snažno inhibirao proliferaciju kontrolnih stanica; već 5. dana eksperimenta primijećeno je smanjenje proliferacije od 75% u odnosu na netretiranu kontrolu. Proliferacija je usporena do te mjere da su stanice pale ispod kritične koncentracije potrebne za uspješno održavanje u kulturi, što je rezultiralo umiranjem stanica. DAPT je usporio i proliferaciju stanica u kokulturi za 52% u odnosu na netretirane stanice u kokulturi. Moguće je da je γ-sekretaza nužna za aktivaciju nekih signalnih puteva uključenih u proliferaciju; no u ovom slučaju to se ne odnosi na put Notch, jer je pokazano da u stanicama 697 ovaj put nije aktivan (Horvat, 2018; Horvat i sur., 2018). Rast u kokulturi nije imao utjecaja na proliferaciju stanica 697, niti na njihovo preživljenje. Slični rezultati pokazani su i promatranjem proliferacije limfocita 697 u kokulturi sa stanicama koje eksprimiraju ligand DLL1 (Horvat, 2018). Ipak, tijekom ponavljanja eksperimenta zaključili smo da uzgoj u kokulturi sa stanicama A1235 pogoduje stanicama 697. Naime, stanice limfocita u kokulturi dulje su preživljavale u niskoj koncentraciji nego limfociti u monokulturi. Moguće je da stanice A1235 stvaraju mikrookoliš koji pridonosi optimalnim uvjetima rasta stanica 697.

U normalnim zrelim B-limfocitima put Notch nije aktivan (Rosati i sur., 2009). Zreli, normalni B-limfociti ne eksprimiraju receptore signalnog puta Notch, ali dokazana je ekspresija receptora Notch1 i Notch2 u razvojnoj fazi B-limfocita u koštanoj srži (He i Pear, 2003). To ukazuje na mogući značaj signalizacije Notch u ranome razvoju B-limfocita. Tome u prilog govori i činjenica da je u određenim fazama razvoja B-limfocita dokazana i ekspresija gena *HES-1*, nizvodnog gena signalnog puta Notch, no njegova funkcija u razvoju limfocita još nije poznata. Novija su istraživanja pokazala da je ligand JAGGED1 osim u osteoblastima koštane srži eksprimiran i u stanicama marginalne zone slezene, mjesta diferencijacije perifernih B-limfocita. Stoga se pretpostavlja da signalni put Notch bitan za diferencijaciju B-limfocita marginalne zone (He i Pear, 2003).

Dosadašnja istraživanja pokazala su ulogu aktivacije signalnog puta Notch u razvoju raznih malignih bolesti. Dok je uloga konstitutivne aktivacije signalnog puta Notch dobro definirana u progresiji akutne limfoblastične leukemije T-limfocita (T-ALL) (Chiaramonte i sur., 2005), utjecaj signalnog puta Notch na leukemijske B-limfocite još uvijek nije u potpunosti objašnjen (Zweidler-McKay i sur., 2005). Prekomjerna ekspresija receptora Notch i aktivacija signalnog puta potvrđena je kod stanica kronične limfoblastične leukemije B-limfocita (Rosati i sur., 2009; Kanamori i sur., 2012). Iako konstitutivna aktivacija signalnog puta Notch nije česta u akutnim limfoblastičnim leukemijama B-limfocita (B-ALL) (Montaño i sur., 2018), potvrđena je ekspresija sva četiri receptora Notch na B-ALL stanicama (Zweidler-McKay i sur., 2005).

Akutne limfoblastične leukemije prekursora B-limfocita (BCP-ALL) najčešći su oblik akutnih limfoblastičnih leukemija kod djece i odraslih. Karakterizira ih klonalna ekspanzija tumorskih prekursora B-limfocita u različitim stadijma sazrijevanja u koštanoj srži. Tumorski se B-limfociti razlikuju od normalnih na temelju različitih antigena koje prezentiraju na površini stanica (Nwabo Kamdje i Krampera, 2011). Aktivacija signalnog puta Notch vezanjem liganda JAGGED1 i JAGGED2 u stanicama akutne limfoblastične leukemije prekursora B-limfocita dovodi do smanjenja proliferacije i odlaska stanica u apoptozu (Zweidler-McKay i sur., 2005). Ovakav odgovor stanica B-ALL na aktivaciju puta potvrđen je induciranjem signalizacije preko konstitutivne aktivacije receptora Notch1, rastom limfocita u kokulturi sa fibroblastima koji eksprimiraju ligande JAGGED1 i JAGGED2, te konstitutivnom ekspresijom nizvodnog gena *HES1* (Zweidler-McKay i sur., 2005). Bez obzira na način aktivacije signalnog puta, svim je slučajevima zajednička povećana ekspresija gena *HES1*. Konstitutivna ekspresija gena *HES1* ima isti učinak na rast stanica B-ALL kao i aktivacija signalnog puta Notch. Daljnja istraživanja pokazala su da je baš ekspresija gena *HES1* zaslužna za inhibiciju rasta i apoptozu preko aktivacije gena *PARP1* (Kannan i sur., 2011). No, neka istraživanja aktivacije puta Notch pomoću drugih kombinacija receptora i liganda pokazala su suprotan efekt. Tako je rast stanica B-ALL u kokulturi sa stromalnim stanicama koštane srži s eksprimiranim ligandima DLL3 i DLL4 uzrokovao vezanje receptore Notch3 i Notch4 i povećano preživljenje limfocita (Nwabo Kamdje i sur, 2011).

Kako smo mi pokušali aktivirati signalni put Notch ligandom JAGGED1, očekivali smo smanjenje u proliferaciji i preživljenju promatranih staničnih linija 697 i Nalm6. No, uspjeli smo pokazati samo da rast u kokulturi sa stanicama koje eksprimiraju ligand JAGGED1 utječe na smanjenje proliferaciju stanične linije Nalm6. Iako su i Nalm6 i 697 stanice akutnih limfoblastičnih leukemija prekursora B-limfocita, njihov je odgovor na rast u kokulturi različit.

Horvat je u doktorskome radu iz 2018. pokazao da uzgojem stanica 697 u kokulturi sa stanicama Jurkat koje eksprimiraju ligande skupina "Delta-like" i Jagged nije došlo do smanjenja proliferacije. No, uzgoj istih stanica u kokulturi sa mišjim stromalnim stanicama OP9 transficiranima sekvencijom ljudskog liganda *DLL1* uzrokovao je pad u preživljenju stanica. Nakon 7 dana rasta u kokulturi u apoptozu je otišlo 56% stanica 697. Stanice OP9 prirodno eksprimiraju ligande Jagged. U stanicama OP9-DLL1 eksprimiran je i ligand DLL, pa one oponašaju mikrookoliš hematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži, te se smatraju optimalnom podlogom za kokulturu hematopoetskih stanica i aktivaciju signalnog puta Notch. Budući da su najsličnije hematopoetskoj niši, vjerojatno eksprimiraju i moguće druge ligande i receptore koji bi mogli sudjelovati u aktivaciji. Dokazano je i da omogućavaju proliferaciju progenitorskih stanica limfoidne loze te mogu usmjeriti razvoj progenitorskih stanica prema prekursorima T-limfocita (Schmitt i Zúñiga-Pflücker, 2002; Taghon i sur., 2005). No, analizom ekspresije nizvodnih gena puta Notch *HES1* i *HEY1* u stanicama 697 nakon rasta u kokulturi nije pokazana aktivacija signalnog puta Notch. Moguće je da je signalni put Notch aktiviran u onim stanicama koje su umrle, te su odvojene od živih na kojima se radila analiza ekspresije nizvodnih gena. Moguće je i da aktivacija signalnog puta Notch u stanicama 697 vezanjem liganda nije moguća zbog strukture kromatina na promotorima gena ovisnima o putu Notch, unutarstaničnog okoliša stanica ili prisutnosti različitih regulatora transkripcije (Wang i sur., 2014). Također, istraživanje epigenetskih modifikacija gena puta Notch i nizvodnih gena kod B-ALL pokazalo je pojačanu metilaciju nekih elemenata signalnog puta, što bi mogao biti još jedan od razloga zašto kod stanica 697 nije došlo do aktivacije signalnog puta (Kuang i sur., 2013). Interakcije između liganada i receptora Notch mogu biti *cis* i *trans*. *Trans* interakcija nastaje između liganda jedne stanice i receptora druge stanice, što rezultira aktivacijom signalnog puta. *Cis* interakcija nastaje između liganda i receptora iste stanice, a novija istraživanja pokazala su da je takva interakcija inhibitorna i onemogućuje aktivaciju signalnog puta preko *trans* interakcija (Guruharsha i sur., 2012). Stanice 697 eksprimiraju ligand JAGGED1, pa je moguće da dolazi do *cis* interakcija s receptorima Notch, čime bi aktivacija signalnog puta bila inhibirana.

Signalni put Notch u raznim se istraživanjima pokušao aktivirati sa solubilnim ligandom. Dok su neka istraživanja pokazala da solubilni ligandi mogu imati antagonističko djelovanje (Klose i sur., 2015), druga su pak pokazala da je moguća aktivacija signalnog puta ako se ligandi imobiliziraju na nekoj vrsti podloge (Lee i sur., 2013). Za aktivaciju receptora potrebna je mehanička sila povlačenja koja uzrokuje konformacijsku promjenu i otkrivanje mjesta cijepanja (Kovall i sur., 2017), pa bi usidrenje

solubilnih liganada za podlogu možda moglo poslužiti kao ta sila. Horvat je u svome doktorskome radu pokušao aktivirati signalni put Notch u stanicama 697 i dodavanjem solubilnog liganda DLL1 u medij i imobilizacijom liganda na želatini. No, do aktivacije signalnog puta Notch nije došlo, moguće iz sličnih razloga kao i kod našeg eksperimenta s ligandom JAGGED1.

Stanice koje smo mi koristili kao podlogu za kokulturu eksprimirale su i ligand DLL1 i ligand JAGGED1. Prisutnost različitih liganada signalnog puta Notch može pridonijeti drugačijem odgovoru limfocita. Možda su potrebni dodatni kofaktori u staničnom okolišu koji oponašaju uvjete kakvi vladaju tijekom određenih faza razvoja B-limfocita da bi došlo do odgovora na aktivaciju signalnog puta Notch u stanicama 697. Stanice OP9 mnogo su sličnije okolišu koštane srži u kojem se prekursori B-limfocita razvijaju u organizmu, pa bi na više načina mogle djelovati na prekursore B-limfocita, između ostaloga i na način da potiču apoptozu. Kod kokulture na stanicama A1235 taj poticaj iz okoliša je nedostajao, pa nije došlo do umiranja stanica.

Različiti odgovori dviju staničnih linija akutne leukemije prekursora B-limfocita na rast u kokulturi dodatno su pokazali kakva je velika heterogenost među naoko sličnim malignim bolestima. Kompleksne interakcije signalnog puta Notch i ostalih signalnih putova uključenih u proliferaciju, preživljenje stanica i apoptozu otežavaju istraživanja utjecaja svakog od njih na razvoj hematoloških oboljenja. No, modulacija signalnog put Notch i dalje obećava kao ciljana terapija za neke od tih bolesti. Ali kako bi terapija bila uspješna, potrebna su daljnja istraživanja utjecaja ovog signalnog puta na ovu kompleksnu i raznoliku skupinu bolesti.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu istražen je utjecaj liganda JAGGED1 na proliferaciju leukemijskih B-limfocita i aktivaciju signalnoga puta Notch.

U prvom dijelu istraživanja konstruiran je plazmid pcDNA3-JAGGED1, plazmid za ekspresiju u eukariotskim stanicama koji je sadržavao sekvenciju ljudskog gena *JAGGED1*. Dobivenim plazmidom transficirane su stanice mišjih fibroblasta linije A9, koje inače ne eksprimiraju ligand JAGGED1. Analizom ekspresije gena *JAGGED1* s plazmida u transficiranim stanicama pokazano je da konstruirani plazmid nosi točkastu *nonsense* mutaciju, te da je eksprimirani protein skraćena verzija liganda JAGGED1.

Stanične linije Nalm6 i 697, stanice akutnih limfoblastičnih leukemija prekursora B-limfocita (B-ALL) nemaju aktivan put Notch, ali eksprimiraju njegove receptore. Uzgojem u kokulturi sa stanicama koje eksprimiraju ligande ovog puta pokušalo se aktivirati put i pratiti staničnu sudbinu. Praćena je proliferacija i preživljenje B-stanica u kokulturi sa stanicama glioblastoma, sa i bez prisustva inhibitora puta Notch. Stanice Nalm6 u kokulturi su imale usporenu proliferaciju, a rast u kokulturi nije utjecao na preživljenje. Kod stanica 697 rast u kokulturi nije smanjio proliferaciju niti utjecao na preživljenje.

LITERATURA

- Abe N, Hozumi K, Hirano K, Yagita H, Habu S. (2010) *Notch ligands transduce different magnitudes of signaling critical for determination of T-cell fate.* Eur J Immunol 40: 2608–2617
- Boyer-Di Ponio J, Wright-Crosnier C, Groyer-Picard M, Driancourt C, Beau I, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. (2007) *Biological function of mutant forms of JAGGED1 proteins in Alagille syndrome: inhibitory effect on Notch signaling.* Hum Mol Genet 16: 2683–2692
- Carrieri F A, Dale J K. (2017) *Turn It Down a Notch.* Front Cell Dev Biol 4: 151
- Chiaramonte R, Basile A, Tassi E, Calzavara E, Cecchinato V, Rossi V i sur. (2005) *A wide role for NOTCH1 signaling in acute leukemia.* Cancer Letters 219: 113–120
- Crawford T Q, Roelink H. (2007) *The Notch Response Inhibitor DAPT Enhances Neuronal Differentiation in Embryonic Stem Cell Derived Embryoid Bodies Independently of Sonic Hedgehog Signaling*. Dev Dyn 236: 886–892
- Dexter J S. (1914) *The analysis of a case of continuous variation in Drosophila by a study of its linkage relations*. Am Nat 48: 712–758
- Dumortier A, Wilson A, Robson MacDonald A, Radtke F. (2005) *Paradigms of Notch Signaling in Mammals.* Int J Hematol 82: 277–284
- Ein Oon C, Bridges E, Sheldon H, Sainson R, Jubb A, Turley H i sur. (2017) *Role of Delta-like 4 in Jagged1-induced tumour angiogenesis and tumour growth.* Oncotarget 8: 40115–40131
- 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(7): 1389–1401
- Fan H, Zhao J, Yan J, Du G, Fu Q, Shi J i sur. (2018) *Effect of Notch1 geneonremyelination in multiple sclerosis in mouse models of acute demyelination.* J Cell Biochem 2018: 1–11
- Guruharsha K G, Kankel M W, Artavanis-Tsakonas S. (2012) *The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway*. Nat Rev Genet 1: 654–666
- Haapasalo A, Kovacs D M. (2011) *The Many Substrates of Presenilin/γ-Secretase.* J Alzheimers Dis 25: 3–28
- He Y, Pear W S. (2003) *Notch signalling in B cells.* Semin Cell Dev Biol 14: 135–142
- Horvat L. (2018) *Uloga putova Notch i PARP u limfocitima*. Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- Horvat L, Antica M, Matulić M. (2018) *Effect of Notch and PARP Pathways' Inhibition in Leukemic Cells.* Cells 7: 58

- Hossain F, Majumder S, Ucar D A, Rodriguez P C, Golde T E, Minter LM i sur. (2018) *Notch Signaling in Myeloid Cells as a Regulator of Tumor Immune Responses.* Front Immunol 9: 1288
- Kanamori E, Itoh M, Tojo M, Koyama T, Nara N, Tohda S. (2012) *Flow cytometric analysis of Notch1 and Jagged1 expression in normal blood cells and leukemia cells.* Exp Ther Med 4: 397–400
- Kannan S, Fang W, Song G, Mullighan C G, Hammitt R, McMurray J, Zweidler-McKay P A. (2011) *Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type–specific mechanism for tumor suppression.* Blood 117: 2891–2900
- Klose R, Berger C, Moll I, Gordian Adam M, Schwarz F, Mohr K i sur. (2015) *Soluble Notch ligand and receptor peptides act antagonistically during angiogenesis*. Cardiovasc Res 107: 153–163
- Kovall R A, Gebelein B, Sprinzak D, Kopan R. (2017) *The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural And Biochemical Insights Into Shape, Sugar, And Force.* Dev Cell 41: 228–241
- 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
- Kuang S, Fang Z, Zweidler-McKay P A, Yang H, Wei Y, Gonzalez-Cervantes E A i sur. (2013) *Epigenetic Inactivation of Notch-Hes Pathway in Human B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.* PLoS ONE 8: e61807
- Laemmli U K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227: 680–685
- LaVoie M J, Selkoe D J. (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 J B, Werbowetski-Ogilvie T E, Lee J, McIntyre B A S, Schnerch A, Hong S i sur. (2013) *Notch-HES1 signaling axis controls hemato-endothelial fate decisions of human embryonic and induced pluripotent stem cells.* Blood 122: 1162–1173
- Lehar S M, Dooley J, Farr A G, Bevan M J. (2005) *Notch ligands Delta1 and Jagged1 transmit distinct signals to Tcell precursors.* Blood 105: 1440–1447
- Li Y, Jin C, Bai H, Gao Y, Sun S, Chen L i sur. (2018) *Human NOTCH4 is a key target of RUNX1 in megakaryocytic differentiation.* Blood 131: 191–201
- Lindsell C E, Shawber C J, Boulter J, Weinmaster G. (1995) *Jagged: A Mammalian Ligand That Activates Notch1*. Cell 80: 909–917

- Liu Y, Li P, Liu K, He Q, Han S, Sun X i sur. (2014) *Timely Inhibition of Notch Signaling by DAPT Promotes Cardiac Differentiation of Murine Pluripotent Stem Cells*. PLoS ONE 9: e109588
- Liu L, Wada H, Matsubara N, Hozumi K, Itoh M. (2017) *Identification of Domains for Efficient Notch Signaling Activity in Immobilized Notch Ligand Proteins.* J Cell Biochem 118: 785–796
- Luca V C, Kim B C, Ge C, Kakuda S, Wu D, Roein-Peikar M i sur. (2017) *Notch-Jagged complex structure implicates a catch bond in tuning ligand sensitivity.* Science 355: 1320–1324
- Mancini S, Mantei N, Dumortier A, Suter U, Robson MacDonald H, Radtke F. (2005) *Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation.* Blood, 105: 2340–2342
- Montaño A, Forero-Castro M, Marchena-Mendoza D, Benito R, Hernández-Rivas J M. (2018) *New Challenges in Targeting Signaling Pathways in Acute Lymphoblastic Leukemia by NGS Approaches: An Update*. Cancers 10: 1–24
- Morgan T H. (1917) *The theory of the gene*. Am Nat 51: 513–544
- Nwabo Kamdje A H, Krampera M. (2011) *Notch signaling in acute lymphoblastic leukemia: any role for stromal microenvironment?* Blood 118: 6506–6514
- Nwabo Kamdje A H, 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
- Pece S, Confalonieri S, Romano P R, Di Fiore P P. (2011) *NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH.* Biochim Biophys Acta 1815: 26–43
- Piovan E, Tosello V, Amadori A, Zanovello P. (2018) *Chemotactic Cues for NOTCH1-Dependent Leukemia.* Front Immunol 9: 633
- Platonova N, Parravicini C, Sensi C, Paoli A, Colombo M, Neri A i sur. (2017) *Identification of small molecules uncoupling the Notch::Jagged interaction through an integrated high-throughput screening.* PLoS ONE 12: e0182640
- Radtke F, Fasnacht N, Robson MacDonald H. (2010) *Notch Signaling in the Immune System.* Immunity 32: 14–27
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K i sur. (2009) *Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells.* Blood 113: 856–865
- Rowther F B, Kardooni H, Warr T. (2012) *TOUCH-UP Gradient Amplification Method.* J Biomol Tech 23: 1–3

- Sambrook J F, Russell D W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Schmitt T M, Zúñiga-Pflücker J C. (2002) *Induction of T Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells by Delta-like-1 In Vitro.* Immunity 17: 749–756
- Sjöqvist M, Andersson E R (2017) *Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate.* Dev Biol http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.032 [Epub ahead of print]
- Steinbuck M P, Winandy S. (2018) *A Review of Notch Processing With New Insights Into Ligand- Independent Notch Signaling in T-Cells.* Front Immunol 9: 1230
- Taghon T N, David E S, Zúñiga-Pflücker J C, Rothenberg E V. (2005) *Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling.* Genes Dev 19: 965–978
- The UniProt Consortium. (2018) *UniProt: the universal protein knowledgebase*. Nucleic Acids Res 46: 2699
- Wang H, Zang C, Taing L, Arnett K L, Wonga Y J, Pear W S i sur. (2014) *NOTCH1–RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers.* Proc Natl Acad Sci 111: 705–710
- Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang Y. (2014) *The γ -secretase complex: from structure to function*. Front Cell Neurosci 8: 427
- Zweidler-McKay P A, He Y, Xu L, Rodriguez C G, Karnell F G, Carpenter A C 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

Popis korištenih programa:

- *AmplifX 1.7.0.*, Nicolas Jullien, Aix-Marseille Université. https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr" Pristupljeno 9.5.2018.
- *Compute pI/Mw*, ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal. https://web.expasy.org/compute_pi/ Pristupljeno 4.7.2018.
- *ImageJ*, Rasband, W S, U.S. National Institutes of Health. https://imagej.nih.gov/ij/ Pristupljeno 4.7.2018.
- *Ligation Calculator*, Genelink. http://www.genelink.com/tools/gl-lc.asp Pristupljeno 14.5.2018.
- *SnapGene software*, GSL Biotech. snapgene.com Pristupljeno 13.1.2019.
- *Translate*, ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal. https://web.expasy.org/translate/ Pristupljeno 4.7.2018.

PRILOZI

Prilog 1. Kodirajuća sekvencija *JAGGED1*

ATGCGTTCCCCACGGACGCGCGGCCGGTCCGGGCGCCCCCTAAGCCTCCTGCTCGCCCTG
CTCTGTGCCCTGCGAGCCAAGGTGTGTGGGGCCTCGGGTCAGTTCGAGTTGGAGATCCTG
TCCATGCAGAACGTGAACGGGGAGCTGCAGAACGGGAACTGCTGCGGCGGCGCCCGGAAC
CCGGGAGACCGCAAGTGCACCCGCGACGAGTGTGACACATACTTCAAAGTGTGCCTCAAG
GAGTATCAGTCCCGCGTCACGGCCGGGGGGCCCTGCAGCTTCGGCTCAGGGTCCACGCCT
GTCATCGGGGGCAACACCTTCAACCTCAAGGCCAGCCGCGGCAACGACCGCAACCGCATC
GTGCTGCCTTTCAGTTTCGCCTGGCCGAGGTCCTATACGTTGCTTGTGGAGGCGTGGGAT
TCCAGTAATGACACCGTTCAACCTGACAGTATTATTGAAAAGGCTTCTCACTCGGGCATG
ATCAACCCCAGCCGGCAGTGGCAGACGCTGAAGCAGAACACGGGCGTTGCCCACTTTGAG
TATCAGATCCGCGTGACCTGTGATGACTACTACTATGGCTTTGGCTGCAATAAGTTCTGC
CGCCCCAGAGATGACTTCTTTGGACACTATGCCTGTGACCAGAATGGCAACAAAACTTGC
ATGGAAGGCTGGATGGGCCCCGAATGTAACAGAGCTATTTGCCGACAAGGCTGCAGTCCT
AAGCATGGGTCTTGCAAACTCCCAGGTGACTGCAGGTGCCAGTACGGCTGGCAAGGCCTG
TACTGTGATAAGTGCATCCCACACCCGGGATGCGTCCACGGCATCTGTAATGAGCCCTGG
CAGTGCCTCTGTGAGACCAACTGGGGCGGCCAGCTCTGTGACAAAGATCTCAATTACTGT
GGGACTCATCAGCCGTGTCTCAACGGGGGAACTTGTAGCAACACAGGCCCTGACAAATAT
CAGTGTTCCTGCCCTGAGGGGTATTCAGGACCCAACTGTGAAATTGCTGAGCACGCCTGC
CTCTCTGATCCCTGTCACAACAGAGGCAGCTGTAAGGAGACCTCCCTGGGCTTTGAGTGT
GAGTGTTCCCCAGGCTGGACCGGCCCCACATGCTCTACAAACATTGATGACTGTTCTCCT
AATAACTGTTCCCACGGGGGCACCTGCCAGGACCTGGTTAACGGATTTAAGTGTGTGTGC
CCCCCACAGTGGACTGGGAAAACGTGCCAGTTAGATGCAAATGAATGTGAGGCCAAACCT
TGTGTAAACGCCAAATCCTGTAAGAATCTCATTGCCAGCTACTACTGCGACTGTCTTCCC
GGCTGGATGGGTCAGAATTGTGACATAAATATTAATGACTGCCTTGGCCAGTGTCAGAAT
GACGCCTCCTGTCGGGATTTGGTTAATGGTTATCGCTGTATCTGTCCACCTGGCTATGCA
GGCGATCACTGTGAGAGAGACATCGATGAATGTGCCAGCAACCCCTGTTTGAATGGGGGT
CACTGTCAGAATGAAATCAACAGATTCCAGTGTCTGTGTCCCACTGGTTTCTCTGGAAAC
CTCTGTCAGCTGGACATCGATTATTGTGAGCCTAATCCCTGCCAGAACGGTGCCCAGTGC
TACAACCGTGCCAGTGACTATTTCTGCAAGTGCCCCGAGGACTATGAGGGCAAGAACTGC
TCACACCTGAAAGACCACTGCCGCACGACCCCCTGTGAAGTGATTGACAGCTGCACAGTG
GCCATGGCTTCCAACGACACACCTGAAGGGGTGCGGTATATTTCCTCCAACGTCTGTGGT
CCTCACGGGAAGTGCAAGAGTCAGTCGGGAGGCAAATTCACCTGTGACTGTAACAAAGGC
TTCACGGGAACATACTGCCATGAAAATATTAATGACTGTGAGAGCAACCCTTGTAGAAAC
GGTGGCACTTGCATCGATGGTGTCAACTCCTACAAGTGCATCTGTAGTGACGGCTGGGAG
GGGGCCTACTGTGAAACCAATATTAATGACTGCAGCCAGAACCCCTGCCACAATGGGGGC
ACGTGTCGCGACCTGGTCAATGACTTCTACTGTGACTGTAAAAATGGGTGGAAAGGAAAG
ACCTGCCACTCACGTGACAGTCAGTGTGATGAGGCCACGTGCAACAACGGTGGCACCTGC
TATGATGAGGGGGATGCTTTTAAGTGCATGTGTCCTGGCGGCTGGGAAGGAACAACCTGT
AACATAGCCCGAAACAGTAGCTGCCTGCCCAACCCCTGCCATAATGGGGGCACATGTGTG
GTCAACGGCGAGTCCTTTACGTGCGTCTGCAAGGAAGGCTGGGAGGGGCCCATCTGTGCT
CAGAATACCAATGACTGCAGCCCTCATCCCTGTTACAACAGCGGCACCTGTGTGGATGGA
GACAACTGGTACCGGTGCGAATGTGCCCCGGGTTTTGCTGGGCCCGACTGCAGAATAAAC
ATCAATGAATGCCAGTCTTCACCTTGTGCCTTTGGAGCGACCTGTGTGGATGAGATCAAT
GGCTACCGGTGTGTCTGCCCTCCAGGGCACAGTGGTGCCAAGTGCCAGGAAGTTTCAGGG
AGACCTTGCATCACCATGGGGAGTGTGATACCAGATGGGGCCAAATGGGATGATGACTGT
AATACCTGCCAGTGCCTGAATGGACGGATCGCCTGCTCAAAGGTCTGGTGTGGCCCTCGA
CCTTGCCTGCTCCACAAAGGGCACAGCGAGTGCCCCAGCGGGCAGAGCTGCATCCCCATC

CTGGACGACCAGTGCTTCGTCCACCCCTGCACTGGTGTGGGCGAGTGTCGGTCTTCCAGT
CTCCAGCCGGTGAAGACAAAGTGCACCTCTGACTCCTATTACCAGGATAACTGTGCGAAC
ATCACATTTACCTTTAACAAGGAGATGATGTCACCAGGTCTTACTACGGAGCACATTTGC
AGTGAATTGAGGAATTTGAATATTTTGAAGAATGTTTCCGCTGAATATTCAATCTACATC
GCTTGCGAGCCTTCCCCTTCAGCGAACAATGAAATACATGTGGCCATTTCTGCTGAAGAT
ATACGGGATGATGGGAACCCGATCAAGGAAATCACTGACAAAATAATCGATCTTGTTAGT
AAACGTGATGGAAACAGCTCGCTGATTGCTGCCGTTGCAGAAGTAAGAGTTCAGAGGCGG
CCTCTGAAGAACAGAACAGATTTCCTTGTTCCCTTGCTGAGCTCTGTCTTAACTGTGGCT
TGGATCTGTTGCTTGGTGACGGCCTTCTACTGGTGCCTGCGGAAGCGGCGGAAGCCGGGC
AGCCACACACACTCAGCCTCTGAGGACAACACCACCAACAACGTGCGGGAGCAGCTGAAC
CAGATCAAAAACCCCATTGAGAAACATGGGGCCAACACGGTCCCCATCAAGGATTATGAG
AACAAGAACTCCAAAATGTCTAAAATAAGGACACACAATTCTGAAGTAGAAGAGGACGAC
ATGGACAAACACCAGCAGAAAGCCCGGTTTGCCAAGCAGCCGGCGTACACGCTGGTAGAC
AGAGAAGAGAAGCCCCCCAACGGCACGCCGACAAAACACCCAAACTGGACAAACAAACAG
GACAACAGAGACTTGGAAAGTGCCCAGAGCTTAAACCGAATGGAGTACATCGTATAG

ŽIVOTOPIS

Maja Šetinc rođena je 29. 04. 1995. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Josipa Račića i Gimnaziju Lucijana Vranjanina. 2013. godine upisala je studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Preddiplomski studij završila je 2016. godine s temom "Programirana stanična smrt".

Iste godine upisuje Diplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tokom ljetnog semestra akademske godine 2016./2017. pohađala je laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka.

Između mjeseca studenog 2017. i studenog 2018. na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka radila je na izradi ovog diplomskog rada pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Maje Matulić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Luke Horvata.

Nekoliko je puta sudjelovala u organizaciji i vođenju radionica Noći biologije, manifestacije za popularizaciju znanosti na Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.