

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Lana Grižančić

**Interakcije između proteina Itch, p63/p73 i mutiranog p53 u tumorskim stanicama**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod mentorstvom dr.sc. Nede Slade i sumentorstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

## **Zahvale**

*Ponajprije bih se htjela zahvaliti mentorici dr.sc. Nedi Slade na pruženoj prilici za ostvarenje ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem svim članovima Laboratorija za proteinsku dinamiku kao i cijelom Zavodu za molekularnu medicinu na pruženom znanju i vještinama koje su bezrezervno dijelili sa mnom.*

*Od srca hvala Nikolini Hanži, mag.mol.biol. na nesebičnoj pomoći i silnom strpljenju te mag.chem. Martini Radić i Martini Pehar što su rad u laboratoriju učinile veselim i poučnim iskustvom.*

*Posebno hvala izv. prof. dr.sc. Petri Korać na su-mentorstvu, trudu i mnogobrojnim sugestijama koje su doprinijele kvaliteti ovog rada.*

*Veliko hvala prijateljima i kolegama koji su uvijek bili tu kada je bilo potrebno i učinili vrijeme studiranja lakšim i zabavnijim.*

*Konačno, neizmjereno hvala cijeloj obitelji, posebice mojim roditeljima na uvijek bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ljubavi.*

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

## Interakcije između proteina Itch, p63/p73 i mutiranog p53 u tumorskim stanicama

Lana Grižančić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Tumor-supresorski gen *TP53* mutiran je u više od 50% tumora čovjeka. Zbog promjena u konformaciji, mutirani protein  $p53^{mut}$  veže se za p53 divljeg tipa te p63 i p73, članove porodice p53 i tako ih inaktivira. Nisku razinu proteina p63 i p73 u stanicama održava ubikvitinska ligaza ITCH koja omogućuje njihovu razgradnju putem proteasoma. Metodom koimunoprecipitacije i analizom metodom *Western blot* određivala sam interakcije između proteina ITCH, p63/p73 i  $p53^{mut}$  u tumorskim stanicama. Potvrdila sam da dolazi do stvaranja interakcija između egzogenog ITCH (divljeg tipa i  $ITCH^{mut}$ ) i izoformi TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta Np63\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta Np73\alpha$  u stanicama koje ne ekspimiraju p53 kao i u stanicama koje ekspimiraju  $p53^{mut}$  ( $p53^{R248W}$ ). Plazmidne vektore s ugrađenim genima za TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta Np63\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta Np73\alpha$  kotransfecirala sam s vektorom za  $ITCH^{mut}$  u stanice koje ekspimiraju  $p53^{R248W}$  kako bih utvrdila utječe li ubikvitinska ligaza ITCH na stvaranje heterokompleksa između  $p53^{mut}$  i drugih članova porodice p53. Pokazala sam da  $ITCH^{mut}$  ne utječe na stvaranje heterokompleksa između  $p53^{mut}$  i izoformi TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta Np63\alpha$  i TAp73 $\beta$ , dok je intenzitet vezanja za  $\Delta Np73\alpha$  bio jači u prisutnosti  $ITCH^{mut}$ . Iako je ITCH glavni regulator razine p63 i p73 u stanicama, moguće je da ima zanemarivo djelovanje na interakcije između  $p53^{mut}$  i p63/p73.

(56 stranica, 20 slika, 4 tablice, 86 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: proteinske interakcije, mutirani p53, p63, p73, ITCH

Voditelj: dr. sc. Neda Slade, znanstvena savjetnica

Suvoditelj (imenovan od strane Biološkog odsjeka): dr. sc. Petra Korać, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Korać, izv. prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Rad prihvaćen: 14. veljače, 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

### Interactions between protein Itch, p63/p73 and mutated p53 in tumor cells

Lana Grižančić

Rooseveltovo trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Tumor suppressor gene *TP53* is mutated in over 50% of human tumors. Altered conformation enables mutated p53, p53<sup>mut</sup>, to form heterocomplex with wild type p53 as well as with p63 and p73, the members of p53 family, making them inactive. Low levels of p63 and p73 are maintained by ubiquitin ligase ITCH and subsequent proteasomal degradation. Performing coimmunoprecipitation assays followed by Western blot analysis I have determined protein interactions between ITCH, p63/p73 and p53<sup>mut</sup> in tumor cells. I confirmed the interactions between exogenous protein ligase ITCH (both wild type and functional mutant) and TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  and  $\Delta$ Np73 $\alpha$  isoforms in p53 null and p53 mutant cell line (p53<sup>R248W</sup>). Expression vectors encoding for TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  and  $\Delta$ Np73 $\alpha$  isoforms were cotransfected with mutated protein ITCH<sup>mut</sup> into the cells expressing p53<sup>R248W</sup> in order to analyze the effect of ubiquitin ligase ITCH on interactions between p53<sup>mut</sup> and p63/p73. I have shown that ITCH<sup>mut</sup> does not affect heterocomplex formation between p53<sup>mut</sup> and TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  and TAp73 $\beta$ , while  $\Delta$ Np73 $\alpha$  forms stronger interactions when ITCH<sup>mut</sup> was present. Although ubiquitin ligase ITCH is the main regulator of p63/p73 protein levels in cells, it has negligible effect on p53<sup>mut</sup> and p63/p73 interactions.

(56 pages, 20 figures, 4 tables, 86 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: protein interactions, mutant p53, p63, p73, ITCH

Supervisor: Dr. Neda Slade, senior scientist

Cosupervisor (appointed by the Department of Biology): Dr. Petra Korać, Assistant Professor

Reviewers: Dr. Petra Korać, Assoc. Prof.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Dr. sc. Tomislav Ivanković, Asst. prof

Thesis accepted: 14 February 2018

## POPIS KRATICA

AA	-	Matična otopina akitilamida
ATP	-	Adenozin 3-fosfat (od engl. <i>adenosine 3-phosphate</i> )
Co-IP	-	Koimunoprecipitacija (od engl. <i>coimmunoprecipitation</i> )
DBD	-	domena koja veže DNA (od engl. <i>DNA binding domain</i> )
ITCH	-	(od engl. <i>Atrophin-1 interacting protein 4</i> )
ITCH <sup>mut</sup>	-	Mutirani protein ITCH
MDM2	-	(od engl. <i>mouse double minute 2 homolog</i> )
p53 <sup>mut</sup>	-	Mutirani protein p53
PRD	-	Područje bogato prolinom (od engl. <i>proline rich domain</i> )
RING	-	(od engl. <i>really interesting new gene</i> )
SAM	-	Sterilni alfa-motiv (od engl. <i>sterile alpha motif</i> )
TAD	-	Transaktivacijsko područje (od engl. <i>transactivation domain</i> )
TID	-	Terminalno inhibitorno područje (od engl. <i>terminal inhibitory domain</i> )
TP53	-	Gen za tumorski protein 53 (od engl. <i>tumor protein 53</i> )
TP63	-	Gen za tumorski protein 63 (od engl. <i>tumor protein 63</i> )
TP73	-	Gen za tumorski protein 73 (od engl. <i>tumor protein 73</i> )

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
1.1 Povijest proteinske porodice p53 .....	2
1.2 Proteinska porodica p53 .....	2
1.3 Geni proteinske porodice p53 .....	3
1.4 Struktura proteina p53 i p63/p73 .....	3
1.5 Izoforme proteina p53/p63/p73 .....	5
1.6 Svojstva izoformi proteina p63/p73 .....	7
1.7 Uloge članova porodice proteina p53 .....	9
1.8 Aktivnost proteina porodice p53 reguliraju posttranslacijske modifikacije .....	13
1.9 Cilj istraživanja .....	18
2 MATERIJALI I METODE .....	19
2.2 Metode .....	20
3 REZULTATI .....	34
3.1 Provjera plazmida nakon umnažanja u elektrokompetentnim bakterijama .....	34
3.2 Ispitivanje učinkovitosti transfekcije .....	34
3.3 Dokaz egzogene ekspresije proteina p63 i p73 .....	35
3.4 Dokazivanje vezanja proteina p63/p73 s proteinom ITCH .....	37
3.5 Dokazivanje vezanja endogenog mutiranog p53 i p63/p73 .....	41
3.6 Utjecaj proteina ITCH na vezanje mutiranog p53 i p63/p73 .....	42
4 RASPRAVA .....	45
4.1 Interakcije između proteina ITCH i p63/p73 .....	45
4.2 Interakcije između proteina p53 <sup>mut</sup> i p63/p73 .....	46
5 ZAKLJUČAK .....	48
6 LITERATURA .....	49

## UVOD

Homeostazu u stanicama reguliraju složeni biokemijski i signalni putovi koji omogućuju održavanje prikladnih uvjeta u stanici poput strogo regulirane prostorne i vremenske sinteze proteina, njihove aktivnosti te procese razgradnje kao odgovor na vanjske signale i stresne uvjete. Signali iz okoline signalnim se kaskadama prenose u jezgru na transkripcijske faktore koji zatim odgovaraju na njih. Krajnji rezultat je sinteza proteina. Različiti transkripcijski faktori primaju informacije te djelujući samostalno ili u kompleksu s drugim transkripcijskim faktorima vežu se na DNA i tako reguliraju ekspresiju nizvodnih gena. Kako bi se omogućio kvalitetan odgovor stanice na promjene okolišnih uvjeta izrazito je važna brza i stroga vremenska kontrola pojavnosti i aktivnosti pojedinih transkripcijskih faktora. To se postiže posttranslacijskim modifikacijama poput fosforilacije, acetilacije i ubikvitinacije koje uključuju kovalentno vezanje funkcionalnih skupina za transkripcijske faktore. Rezultat je njihova funkcionalna promjena, aktivacija i inaktivacija, stabilizacija i razgradnja ili promjena u postizanju interakcija s drugim proteinima i transkripcijskim faktorima. Stoga je od iznimne važnosti točno i precizno regulirati procese koji uključuju posttranslacijske modifikacije što se postiže enzimima visoke specifičnosti za ciljane transkripcijske faktore.

Osim precizne prostorne i vremenske pojavnosti transkripcijskih faktora, od velikog značaja je i njihova aktivnost, odnosno pouzdanost u obavljanju funkcionalnih zadaća. Izvor problema predstavljaju mutacije u genima za transkripcijske faktore ili specifičnim enzimima za posttranslacijske modifikacije koje mogu znatno utjecati na samu aktivnost tih proteina. S obzirom na to da takvi proteini imaju više domena, ovisno o tome u kojoj domeni se dogodila mutacija, može doći do promjene aktivnosti ili konformacijske promjene što rezultira neadekvatnim interakcijama s DNA ili drugim proteinima. Rezultat toga su promijenjeni obrasci ekspresije što dovodi do poremećene homeostaze u stanicama. Takve stanice imaju onkogeni potencijal i vrlo lako postaju tumorske.

Jedan od najvažnijih transkripcijskih faktora je tumor-supresorski protein p53. Aktivira se kao odgovor na stres, uključujući i oštećenje DNA, tako da regulira stanični ciklus, potiče apoptozu i stanično starenje te sprečava nastanak tumora. Čak 50% tumorskih stanica ima mutaciju u genu *TP53*. Nekim mutacijama p53 stječe onkogeno svojstva što doprinosi nekontroliranoj diobi i progresiji tumorskih stanica. U istu porodicu proteina spadaju i proteini p63 i p73 koji imaju funkcije slične proteinu p53, ali i potpuno nove funkcije.



## 1.1 Povijest proteinske porodice p53

Protein p53 otkriven je 1979. godine kada je izoliran iz mišjih i ljudskih tumorskih stanica zaraženih virusom SV40 (od engl. *simian virus 40*) kao protein koji ulazi u interakcije s velikim T antigenom (Lane i Crawford, 1979; Linzer i Levine 1979). Predložen je kao onkogeni protein, s obzirom na to da je zabilježena visoka koncentracija tog proteina u mnogim tumorskim stanicama, kao i da zajedno s proteinom H-Ras potiče transformaciju primarnih stanica u kulturi (Eliyahu i sur., 1984). Kasnije se ipak pokazalo da prekomjerna ekspresija divljeg tipa proteina p53 utječe na potiskivanje tumorigenog potencijala, za razliku od mutiranog oblika te se on počinje smatrati tumor-supresorom (Eliyahu *et al.*, 1989).

Danas se smatra da je protein p53 jedan od najvažnijih tumorskih supresora koji ima ključnu ulogu u tumorogenezi. Odgovoran je za regulaciju staničnog ciklusa, kao i staničnog odgovora na stres. Kao odgovor na stres vodi stanicu u zastoj staničnog ciklusa te, ako je potrebno, u apoptozu i tako sprečava nastanak tumora.

1997. godine otkriven je proteinski homolog p73 (Kaghad i sur., 1997) te nedugo kasnije i protein p63 (nazvan i protein p51, p40, p73L) (Yang i sur., 1998). Strukture i funkcije tih proteina jesu slične, ali nisu jednake kao one proteina p53. Zbog sposobnosti sva tri proteina da djeluju kao transkripcijski faktori, odnosno da utječu na iste stanične odgovore poput zastoja staničnog ciklusa i apoptoze te sličnosti u strukturnoj organizaciji gena i proteina, smatraju se srodnicima te tvore porodicu proteina p53 (Levrero i sur., 2000).

## 1.2 Proteinska porodica p53

Funkcionalne i filogenetske analize pokazale su da je protein p63 evolucijski najstariji član porodice iz kojeg su se kasnije odvojili protein p73 i naposljetku protein p53. To podupire i činjenica da proteini p63 i p73 međusobno pokazuju veću razinu homologije u aminokiselinskom slijedu u odnosu na najmlađeg člana, protein p53 (Yang i sur., 2002). Također, sva tri gena pokazuju sličnu organizaciju kodirajućih i nekodirajućih regija gena, eksona i introna (Yang i sur., 1998). Među svim članovima porodice proteina p53 najviše je očuvana središnja, domena koja veže DNA između proteina p63 i p73 koji su filogenetski srodniji. Ta podudarnost aminokiselina središnje domene je najveća u regiji koja je u neposrednoj interakciji s DNA. Regulatorno područje na C-kraju slabije je očuvano, dok je najmanje očuvano transaktivacijsko područje na N-kraju proteina (Kaghad i sur., 1997).

Što se tiče evolucijske očuvanosti između vrsta, protein p63 pokazuje najviši stupanj homologije među različitim vrstama. Tako se ljudski protein p63 i mišji homolog razlikuju u

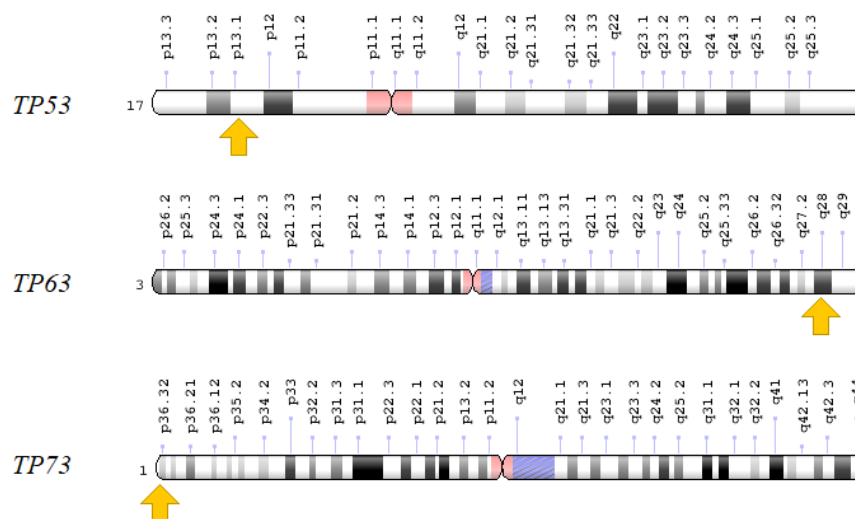
samo osam aminokiselina, odnosno primarni slijed aminokiselina između ljudskog i mišjeg homologa p63 je 99% podudaran. Proteini p73 i p53 pokazuju manju očuvanost između vrsta, pogotovo na N- i C- krajevima proteina (Kaghad i sur., 1997).

### 1.3 Geni proteinske porodice p53

Postoji izrazita sličnost u organizaciji gena kod članova proteinske porodice p53. Gen za protein p53, *TP53* (od engl. *tumor protein 53*) smješten je na kromosomu 17p13.1, veličine 20 kb, sadrži 11 eksona koji prepisuju 3,0 kb mRNA koja kodira za 393 aminokiseline i daje protein veličine oko 53 kDa (Pecorino, 2008).

Gen za protein p63, *TP63* (od engl. *tumor protein p63*) veličine je oko 65 kb, sastoji se od 15 eksona, nalazi se na kromosomu 3q27-29 i kodira za protein ukupne duljine od 680 aminokiselina (Trink i sur., 1998).

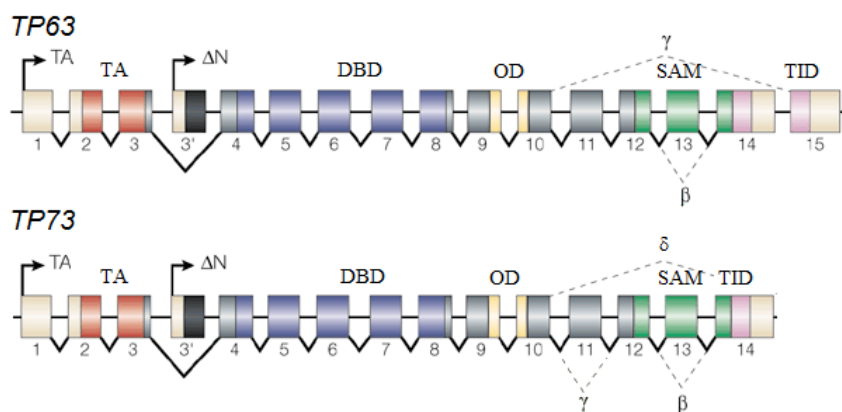
Gen *TP73* (od engl. *tumor protein 73*) smješten je na kromosomu 1p36.33, na lokusu koji je često deletiran u različitim tumorima poput neuroblastoma, melanoma i karcinoma pluća. Veličine je oko 65 kb i sastoji se od 14 eksona koji kodiraju za protein najveće duljine od 636 aminokiselina (Slika 1) (Yang i sur., 1998).



**Slika 1. Smještaj gena članova proteinske porodice p53.** Žute strelice označuju položaj gena članova proteinske porodice p53. Gen *TP53* se nalazi na kromosomu 17p13.1, *TP63* na kromosomu 3q28, a *TP73* na 1p36.33. (Preuzeto i prolagođeno: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene>)

### 1.4 Struktura proteina p53 i p63/p73

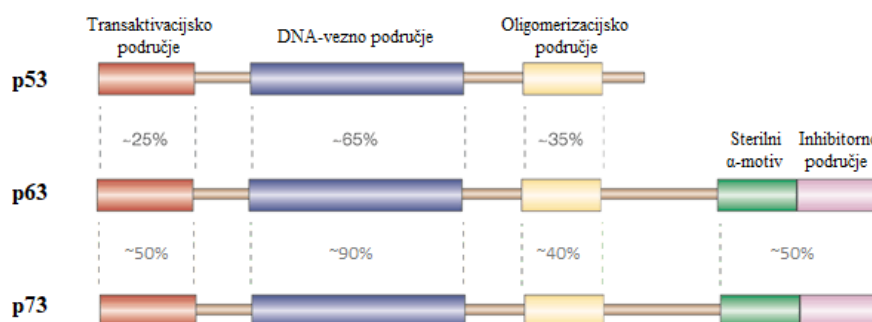
Sva tri člana proteinske porodice p53 dijele vrlo visok stupanj homologije kako na razini gena, tako i u proteinskoj strukturi.



**slika 2. Struktura gena TP63 i TP73.** Kvadratići i brojevi ispod kvadratića predstavljaju eksone, dok linije kojima su povezani predstavljaju introne. Linije prikazuju mjesta alternativnog prekrasjanja različitih izoformi, a strelice promotore; na promotoru P1, uzvodno od eksona 1 započinje transkripcija izoforme TA, dok s promotora P2 započinje transkripcija izoforme ΔN. Bojama su označene najvažnije domene; crveno – transaktivacijsko područje (TA), plavo – domena koja veže DNA (DBD), žuto – oligomerizacijsko područje (OD), zeleno – sterilni alfa-motiv (SAM), ružičasto – inhibitorno područje (TID). (Preuzeto i prilagođeno: Yang i McKeon, 2000)

Sastoje se od nekoliko funkcionalnih područja koja su karakteristična za tu skupinu proteina: područje uključeno u aktivaciju transkripcije na N-kraju, TAD1 i TAD2 (od engl. *transactivation domain*) na koje se vežu proteini koji potiču transkripciju, područje bogato prolinom (PRD, od engl. *proline rich domain*) nakon kojeg je smještena regija uključena u represiju. U središnjem dijelu je smještena domena koja veže DNA (DBD, od engl. *DNA binding domain*) koja je najveća, evolucijski najbolje očuvana i gdje se događaju gotovo sve onkogene mutacije. Slijedi oligomerizacijsko (tetramerizacijsko) područje (OD, od engl. *oligomerization domain*) sa signalom za lokalizaciju u jezgri, NLS (od engl. *nuclear localization signal*) i na C-kraju je regulatorno područje (CTD, od engl. *C-terminal regulatory domain*) koje je mnogo dulje kod proteina p63 i p73 (Bénard i sur., 2003). Ono sadrži sterilni alfa-motiv, SAM (od engl. *sterile alpha motif*) koji je važan za stvaranje inter- i intramolekulskih interakcija među proteinima koji reguliraju razvoj i diferencijaciju (Schultz i sur., 1997), kao i područje za zaustavljanje transkripcije, TID (od engl. *transcriptional inhibitory domain*) koja je u interakciji s transaktivacijskim područjem, a posjeduju je samo izoforme p63α i p73α (Serber i sur., 2002). Na C-kraju je područje karakteristično samo za proteine p63 i p73 i nije prisutno kod proteina p53 što ukazuje na jedinstvene funkcije proteina p63 i p73 (Slika 2). Protein p53 na svom C-kraju posjeduje bazično područje, BD (od engl. *basic domain*) koje ima regulatornu ulogu. Sve ove regije su potrebne za uspješno vezanje za DNA i učinkovitu aktivaciju transkripcije ciljnih gena (Chi i sur., 1999).

Najveća razina homologije među članovima proteinske porodice p53 je u domeni koja veže DNA. Podudarnost u toj regiji između proteina p63 i p73 iznosi čak 90% (Deyoung i Ellisen, 2007), dok je između proteina p53 i p63/p73 homologija oko 60% (Slika 3). Visoka razina homologije upućuje na to da se sva tri proteina mogu vezati na iste sljedove DNA i potaknuti transkripciju istih gena. Nadalje, visok stupanj homologije u oligomerizacijskom području ukazuje na sposobnost stvaranja interakcija između članova porodice proteina p53, odnosno stvaranje hetero- i homooligomera (Davison i sur., 1999).



**Slika 3. Usporedna struktura gena za proteine p53, TAp63*α* i TAp73*α*.** Osnovni elementi strukture gena za proteine p53, TAp63*α* i TAp73*α*: crveno – transaktivacijsko područje (TA), plavo – domena koja veže DNA (DBD), žuto – oligomerizacijsko područje (OD), zeleno – sterilni  $\alpha$ -motiv (SAM), ružičasto – inhibitorno područje (TID). Postotcima je označen stupanj identičnosti između pojedinih izoformi. (Preuzeto i prilagođeno: Yang i McKeon, 2000)

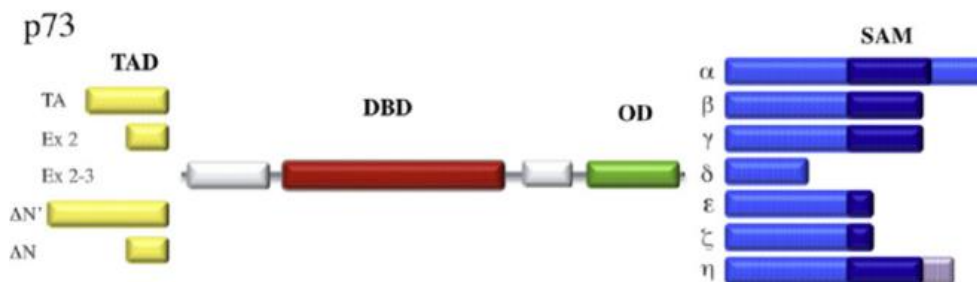
## 1.5 Izoforme proteina p53/p63/p73

Geni koji kodiraju za proteine p53, p63 i p73 vrlo su složene strukture i kodiraju za različite izoforme. Imaju dva različita promotora koji daju proteine različitih N-krajeva i prepisuju mRNA koja se može različito alternativno izrezivati, a rezultat su proteinski produkti različite strukture i funkcije. Veći dio prekrajanja događa se na 3'-kraju, između eksona XII i XV, odnosno regiji koja je specifična samo za gene *TP63* i *TP73* i nije prisutna u genu *TP53*. Posljedica toga je stvaranje proteinskih izoformi s različitim slijedom na 3'-kraju (De Laurenzi i sur., 1998).

Osim izoformi koje su posljedica alternativnog prekrajanja bliže C-kraju, geni za proteine p63/p73 sadrže dva promotora koji omogućuju prepisivanje proteina cijele duljine. Izoforme TAp63/TAp73 prepisuju se s promotora P1 koji se nalazi uzvodno od eksona I, a izoforme  $\Delta$ Np63/ $\Delta$ Np73 čija transkripcija započinje na eksonu III s promotora P2. Izoformama  $\Delta$ N manjka dio transaktivacijskog područja, TAD1, slijed od ukupno 39 aminokiselina na N-

kraju, dok izoforme TAp63/TAp73 imaju cijelovito TA područje (Murray-Zmijewski i sur., 2006). Izoforme cijele duljine, TA su strukturno i funkcionalno slične divljem tipu proteina p53 i posjeduju tumor-supresorska i proapoptotska svojstva, dok skraćene izoforme proteina,  $\Delta N$ , kojima manjka transaktivacijsko područje, imaju dominantno negativan učinak, tj. proteinskim interakcijama onemogućavaju normalnu funkciju proteina p53, p63 i p73 cijelih duljina i djeluju kao onkogeni (Yang i sur., 1998). Kod proteina p73, zbog alternativnog izrezivanja na 5'-kraju nastaju i izoforme Ex2p73 i Ex2/3 koje se prepisuju s prvog promotora i nedostaju im ekson 2, odnosno eksoni 2 i 3. Izoforma  $\Delta N'$ p73 koja zbog korištenja drugog mjesta za početak translacije u konačnici kodira za isti protein kao i  $\Delta N$ p73 čija transkripcija kreće s promotora P2 (Moll i Slade, 2004; Scoumanne i sur., 2005).

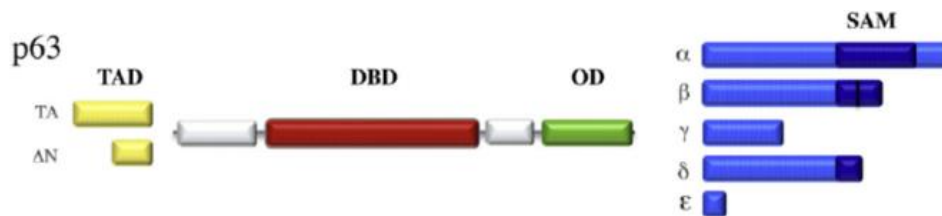
Zbog alternativnog prekrajanja na C-kraju, protein p73 eksprimiran je u najmanje šest izoformi,  $\alpha$ - $\zeta$ . Izoforma TAp73 $\alpha$  nastaje kao proizvod transkripta koji obuhvaća sve eksone, I-XIV, protein je cijele duljine, a gradi ga 636 aminokiselina. Izoformi TAp73 $\beta$  nedostaje ekson XIII i ukupno ima 499 aminokiselina, TAp73 $\gamma$  nedostaje ekson XI, a TAp73 $\delta$  nedostaju eksoni XI-XIII. Izoformi TAp73 $\epsilon$  nedostaju eksoni XI i XIII, a izoformi TAp73 $\zeta$  eksoni XI i XII. Izoforma TAp73 $\eta$  je najbližnja izoformi TAp73 $\alpha$ , ali se različito prekraja na eksonu XIV (Slika 4). Također su pronađene i druge izoforme, i u normalnim i u tumorskim stanicama, ali one nisu u potpunosti definirane (Murray-Zmijewski i sur., 2006).



**Slika 4. Struktura izoformi proteina p73.** Alternativna prekrajanja na C- i N- kraju te različiti promotori omogućuju stvaranje velikog broja izoformi sa zajedničkim područjima: transaktivacijsko područje (TAD), domena koja veže DNA (DBD), oligomerizacijsko područje (OD), sterilni  $\alpha$ -motiv (SAM). (Preuzeto i prilagođeno: Allocati i sur., 2012)

Slično kao i kod gena *TP73*, struktura gena *TP63* omogućuje stvaranje različitih izoformi (Slika 5); izoforma TAp63 $\alpha$  nastaje od transkripta koji sadrži svih 14 eksona i daje proteinski produkt cijele dužine, izoforma TAp63 $\beta$  kojoj nedostaje C'-kraj (nakon eksona XII) i izoforma TAp63 $\gamma$  koja ima internu deleciju između eksona X-XV (Yang i sur., 1998). Izoforme TAp63 $\gamma$  i TAp73 $\gamma$  strukturno su najbližnije proteinu p53 cijele dužine. Istraživanja

su pokazala da su izoforme TAp63 $\gamma$  i TAp73 $\beta$  funkcionalno najbližnje divljem tipu proteina p53 i mogu gotovo jednako dobro aktivirati ekspresiju specifičnih gena i usmjeravati apoptozu kao protein p53.



**Slika 5. Struktura izoformi proteina p63.** Alternativna prekranja na C-kraju te različiti promotori omogućuju stvaranje velikog broja izoformi sa zajedničkim područjima: transaktivacijsko područje (TAD), domena koja veže DNA (DBD), oligomerizacijsko područje (OD), sterilni  $\alpha$ -motiv (SAM). (Preuzeto i prilagođeno: Allocati i sur., 2012)

Gen *TP53* također sadrži dva promotora, prvi promotor P1 s kojeg se prepisuju izoforme sa cjelovitim transaktivacijskim područjem, p53 i izoforme  $\Delta 40p53$  koje nemaju isto inicijacijsko mjesto translacije ili dolazi do izrezivanja dijela transaktivacijskog područja pa nije cjelovito; i alternativni promotor, P2 s kojeg se prepisuju izoforme  $\Delta 133p53$ , a koji se nalazi unutar introna IV (Bourdon i sur., 2005). Zbog nedostatka dijela ili cjelovitog transaktivacijskog područja, izoforme  $\Delta 40p53$  i  $\Delta 133p53$  se nazivaju izoformama  $\Delta Np53$  (Courtois i sur., 2004).

## 1.6 Svojstva izoformi proteina p63/p73

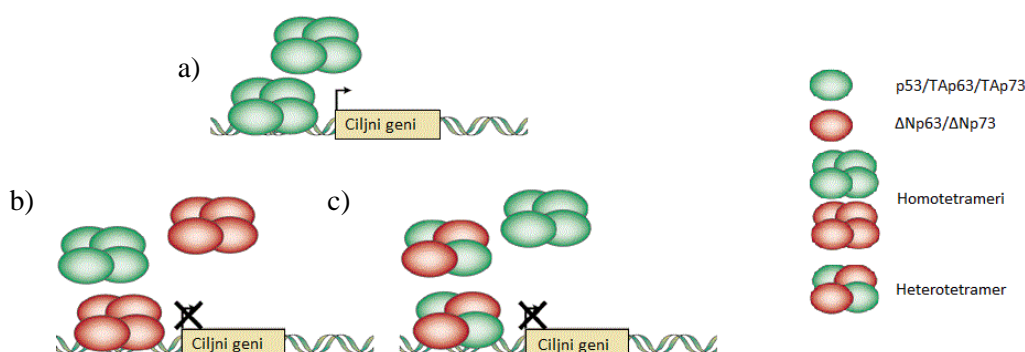
Koncentracije pojedinih izoformi članova porodice proteina p53 reguliraju se mehanizmom negativne povratne sprege. Proteini p53 i TAp73 vežu se na P2, alternativni promotor gena *TP73* i aktiviraju transkripciju  $\Delta Np73$ , dok  $\Delta Np73$  inhibira njihovo djelovanje kompeticijom za vezna mjesta na DNA ili stvaranjem kompleksa s TAp73 i p53 (Zaika i sur., 2002). Kada dođe do stresnih uvjeta, smanji se koncentracija izoformi  $\Delta N$  što omogućuje aktivaciju proteina p53, TAp63 i TAp73 i zastoj u staničnom ciklusu a po potrebi poticanje apoptoze (Liefer i sur., 2000).

Izoforme TAp73 mogu se vezati na ista vezna mjesta na DNA kao i protein p53 i potaknuti transkripciju ciljnih gena važnih za zastoj staničnog ciklusa i poticanje apoptoze. Izoforma  $\Delta Np73$  može se vezati za ista promotorska mjesta i spriječiti vezanje proteina p53 i TAp73, ali ne može potaknuti transkripciju tih ciljnih gena (Melino i sur., 2003). Drugi način

inhibicije je stvaranje heterooligomernih kompleksa s izoformama TAp63/TAp73 te s s p53 što također onemogućava vezanje za ciljno mjesto na molekuli DNA (Zaika i sur., 2002; Slade i sur., 2004). Tako protein  $\Delta$ Np73 ostvaruje svoj dominantno-negativni učinak na proteine p53 i TAp73.

Mehanizam kojim se p73 aktivira kao odgovor na stanični stres je većinom posttranslacijskim modifikacijama. U normalnim staničnim uvjetima razina proteina p73 održava se u niskim koncentracijama njegovom brzom razgradnjom putem proteasoma. Kao odgovor na stres dolazi do nakupljanja izoforme TAp73, što može djelovati na zaustavljanje staničnog ciklusa i poticanje apoptoze čak i kad p53 nije prisutan, dok se izoforma  $\Delta$ Np73 razgrađuje kao odgovor na stresne uvjete u stanici. Razgradnjom izoforme  $\Delta$ Np73 prestaje dominantno-negativan učinak na TAp73 i p53 te oni mogu vršiti svoje proapoptotske zadaće (Zaika i sur., 2002) (Slika 6) .

Protein p73 rijetko je mutiran ili deletiran u ljudskim tumorima (Yoshikawa i sur., 1999) što upućuje na činjenicu da nije klasični tumor supresor, ali narušena ravnoteža između izoformi TAp73 i  $\Delta$ Np73 ima značajnu ulogu u tumorigenezi (Zaika i sur., 2002; Concin i sur., 2004). Omjeri koncentracija izoformi TAp73 i  $\Delta$ Np73 određuju sudbinu stanice; hoće li doći do zastoja staničnog ciklusa, apoptoze ili nekontrolirane proliferacije (Rossi i sur., 2005). Također je pokazano kako izoforme  $\Delta$ Np73 stabiliziraju TAp73 uzrokujući njihovo nakupljanje uz istodobnu inaktivaciju (Slade i sur., 2004). Povećana ekspresija izoforme  $\Delta$ Np73 povezuje se s napredovanjem tumorigeneze, smanjenim djelovanjem kemoterapeutika i lošijim prognozama u pojedinim tipovima raka kod ljudi što može ukazivati na međusobno djelovanje izoformi TAp73 i  $\Delta$ Np73 u progresiji tumora (Concin i sur., 2004).



**Slika 6. Kompeticija za vezna mjesta na molekuli DNA.** U prisutnosti isključivo izoformi koje sadrže transaktivacijsku domenu dolazi do stvaranja homotetramera, vezanja za molekulu DNA i ekspresije ciljnih proteina (slika a). Ukoliko su prisutni i homotetrameri sačinjeni od izoformi  $\Delta$ N i heterotetrameri dolazi do kompeticije za vezna mjesta na DNA te se oni preferencijalno vežu i onemogućuju ekspresiju ciljnih gena (slike b i c). (Preuzeto i prilagođeno: Yang i McKeon, 2000)

## 1.7 Uloge članova porodice proteina p53

Osim što mogu potaknuti aktivaciju zajedničkih ciljnih gena specifičnih za tumor supresorski protein p53 koji su uglavnom uključeni u odgovor na stanični stres, proteini p63 i p73 uključeni su i u regulaciju mnogih drugih gena važnih za razvoj i diferencijaciju. Protein p63 važan je u diferencijaciji slojeva kože i razvoju udova (Mills i sur., 1999), a protein p73 u neurogenezi (Yang i McKeon, 2000). Protein p73 je normalno eksprimiran u svim ljudskim tkivima u vrlo niskoj razini (Kovalev i sur.,1998), dok je ekspresija proteina p63, posebice izoforme  $\Delta Np63$ , ograničena na bazalne stanice epitela kože, prostate i urogenitalnog trakta (Yang i sur., 1998).

**Tablica 1. Usporedba funkcija članova porodice proteina p53.** (+++ - jako utječe, ++ - utječe, + - slabo utječe, -- - ne utječe)

Izoforma	Zastoj u staničnom ciklusu	Apoptoza	Razvoj
p53	+++	+++	+
TAp63	++	+	+++
$\Delta Np63$	-	-	+
TAp73	++	++	+++
$\Delta Np73$	-	-	++

### 1.7.1 Protein p53 kao tumor-supresor

Protein p53, nazvan još i *čuvarom genoma*, jedan je od najvažnijih tumor-supresorskih proteina te kao takav ima značajnu ulogu u odgovoru na stresne uvjete. Aktivirani p53 potiče apoptozu, zastoj u staničnom ciklusu ili senescenciju što za posljedicu ima sprečavanje nastanka tumora. Zastoj u staničnom ciklusu ili stanična smrt koju aktivira protein p53 sprečava replikaciju oštećene ili izmijenjene DNA i diobu genetički promijenjenih stanica iz čega proizlazi njegova središnja uloga u održavanju integriteta i nepromjenjivosti genoma (Lane, 1992). Gen *TP53* najpoznatiji je tumor-supresorski gen i najčešće mjesto genetičkih nepravilnosti pronađeno u tumorima jer čak 50% tumorskih stanica ima mutaciju u tom genu. Mutacija se najčešće javlja u području vezanja za DNA. Posljedica toga je promijenjena konformacija proteina i njegova nemogućnost vezanja na molekulu DNA i regulaciju



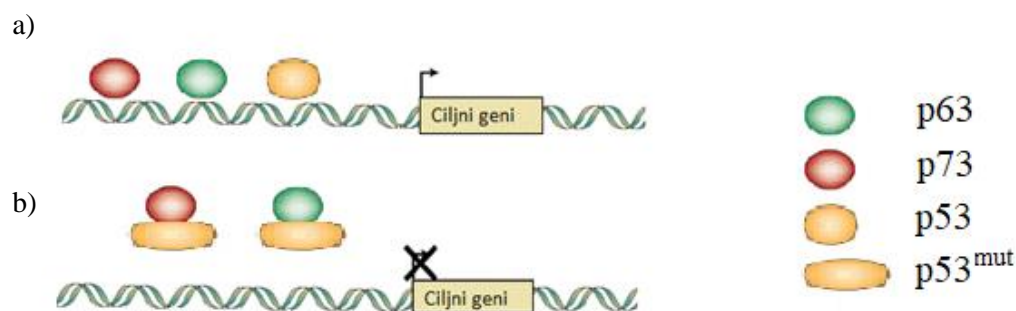
transkripcije. Dokaz tome su transgenični p53<sup>-/-</sup> miševi koji su skloni razvoju spontanih i induciranih tumora što ima za posljedicu vrlo kratak životni vijek (Donehower i sur., 1992).

### 1.7.2 Proteini p63/p73 kao pomoćnici proteina p53

S obzirom na to da proteini p63 i p73 dijele veliku strukturnu homologiju s proteinom p53, mogu se vezati na promotorske regije specifične za transkripcijski faktor p53, te aktivirati nizvodne ciljane gene poput gena *p21*, *bax*, *mdm2* (Moll i Slade, 2004). Kada su prekomjerno eksprimirani, proteini TAp63 i TAp73 mogu aktivirati gene uključene u zastoj staničnog ciklusa i apoptozu, a koji su inače regulirani proteinom p53 (Lokshin i sur., 2007). Postoje i funkcionalne razlike između izoformi TAp63 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$ . Dok izoforma TAp73 $\alpha$  ima vrlo izraženu tranaktivacijsku i pro-apoptotsku aktivnost, izoforma TAp63 $\alpha$  ima gotovo zanemarivu ulogu u indukciji apoptoze (Yang i sur., 1998). Razlog tome je inhibitorna domena od 27 kDa na C-kraju izoforme TAp63 $\alpha$  koja onemogućuje transkripcijsku aktivnost jer stvara interakcije s njenom TA domenom (Serber i sur., 2002). U staničnim uvjetima kada nisu prisutni proteini p63 i p73 (p63<sup>-/-</sup>;p73<sup>-/-</sup>) nakon oštećenja DNA ne dolazi do apoptoze iako je protein p53 intaktan. Razlog tome je nemogućnost samog proteina p53 da se veže za genske promotore koji će inducirati staničnu smrt te su mu za normalno funkcioniranje potrebni ili protein p63 ili p73 (Flores i sur., 2002).

### 1.7.3 Interakcije mutiranog proteina p53 i proteina p63/p73

Proteini p63 i p73 međusobno stvaraju interakcije preko oligomerizacijskih (tetramerizacijskih) domena. Dolazi do stvaranja homo- ili heterotetramera čiji je sadržaj članova proporcionalan trenutnoj razini pojedinog proteina u jezgri (Davison i sur., 1999). Interakcije između mutiranih oblika proteina p53 i proteina TAp63 i TAp73 stvaraju se između domena koje vežu DNA, a ne oligomerizacijskih domena (Gaiddon i sur., 2001). Posljedica je to strukturnih promjena u središnjoj domeni proteina p53 do kojih dolazi zbog nastalih mutacija (Wong i sur., 1999). Zbog toga se proteini p63/p73 u interakciji s mutiranim p53 ne mogu svojim veznim područjima vezati za DNA pa dolazi do smanjene transkripcijske aktivnosti tih proteina i njihove sposobnosti da potaknu zastoj staničnog ciklusa i apoptozu (Di Como i sur., 1999; Marin i sur., 2000; Strano i sur., 2001; Gaiddon i sur., 2001). Dakle, mutirani oblik proteina p53 sprečava djelovanje proteina TAp63 i TAp73 tako da se veže na njih i onemogućava njihovo vezanje za molekulu DNA (Slika 7) i regulaciju transkripcije (Gaiddon i sur., 2001; Strano i sur., 2000; Strano i sur., 2002).



**Slika 7. Utjecaj mutiranog proteina p53 na funkciju proteina p63 i p73.** Promjenom konformacije koja je posljedica mutacija dolazi do otkrivanja domene koja veže DNA koja stvara interakcije s oligomerizacijskom domenom proteina TAp63 i TAp73 te onemogućuje njihovo vezanje za molekulu DNA i nema transkripcije ciljnih gena (slika a). Kada protein p53 nije mutiran, nema stvaranja heterokompleksa i može doći do vezanja i ekspresije ciljanih gena (slika b). (Preuzeto i prilagođeno: Ferraiuolo i sur., 2016)

#### 1.7.4 Uloga proteina p63

Protein p63 je posebice eksprimiran u bazalnim stanicama mnogih epitelnih tkiva poput epidermisa, vrata maternice, urinarnog trakta i prostate. Miševima bez ekspresije proteina p63 nedostaju slojevi epiderme, pločasti epitel, nemaju mliječne žlijezde, suzne žlijezde i žlijezde slinovnice. Kako ne postoji ektodermalna barijera, umiru nedugo nakon rođenja zbog dehidracije. Nema diferencijacije ektodermalnog nabora koji je potreban za nastanak udova (Yang i sur., 1999). Izoforma TAp63 odgovorna je za održavanje odraslih matičnih stanica kože i sprečavanje preuranjenog starenja tkiva što je pokazano na transgeničnim miševima TAp63<sup>-/-</sup> kojima je nedostajala izoforma TAp63, a imali su česte ulceracije na koži i preuranjeno su starili. Imali su značajno kraći životni vijek te su češće razvijali sarkome i karcinome (Su i sur., 2009). Prekomjerna ekspresija izoforme  $\Delta$ Np63 $\alpha$  potiče proliferaciju, održava preživljenje te ne dolazi do senescencije. Stoga se  $\Delta$ Np63 $\alpha$  smatra onkogenom koji potiče proliferaciju matičnih stanica kože, odnosno tumorogenezu (Keyes i sur., 2011). Osim što djeluje kao onkogen, izoforma  $\Delta$ Np63 $\alpha$  je nužna za diferencijaciju u epidermalne stanice (Medawar i sur., 2008). Eksprimirana je u bazalnom sloju, epitelnim matičnim stanicama gdje omogućava visoku stopu proliferacije (Parsa i sur., 1999). Dakle, izoforme proteina p63 imaju važnu ulogu u razvoju epiderme, staničnoj proliferaciji i izbjegavanju starenja, a poremećaj njihove ravnoteže dovodi do razvoja tumora (Moll i Slade, 2004).

Izoforma  $\Delta$ Np63 se može vezati za DNA i spriječiti vezanje drugih transkripcijskih faktora, poput proteina p53 ili izoformi TAp63 i TAp73 i tako ih inaktivirati. Kada dođe do stresnih uvjeta, smanji se koncentracija  $\Delta$ Np63 što omogućuje djelovanje proteina p53 i TAp63 te zastoj staničnog ciklusa i, po potrebi, usmjeravanje u apoptozu (Liefer i sur., 2000).

Mutacije gena *TP63* u zametnim stanicama ljudi dovode do razvojnih poremećaja poput ekto daktilije (malformacije šake i stopala) i rascjepa usne i nepca (Little i Jochemsen, 2002). Posljedica je to nemogućnosti vezanja mutiranog proteina na DNA i poremećene aktivacije ciljnih gena koji utječu na diferenciju (Celli i sur., 1999). Također, dolazi do nepotpunog razvoja mliječnih i suznih žlijezda te zuba. Mutacije se nasljeđuju autosomalno dominantno, dok je potpuna deficijencija proteina p63 letalna (van Bokhoven i McKeon, 2002).

Protein p63 najvažnija je regulatorna karika u epidermalnom razvoju, dok je protein p73 važan u razvoju živčanog sustava. Pokazano je i da protein p63 sudjeluje u održavanju neurona i kortikalnih prekursora, ali isto tako da u odsutnosti proteina p63, izoforma  $\Delta Np73$  nadomješta njegovu funkciju, maskira njegovo djelovanje i omogućuje normalan razvoj mozga i cjelokupnog živčanog sustava (Cancino i sur., 2015).

### 1.7.5 Uloga proteina p73

Mutacije gena *TP73* vrlo su rijetke. Međutim, lokus je često deletiran u različitim tumorima poput neuroblastoma, melanoma i karcinoma pluća. Osim što ima proapoptotsku ulogu, protein p73 ima i različite razvojne uloge te uloge u diferencijaciji. Ključan je u razvoju živčanog sustava, dinamici cerebrospinalne tekućine i mukoze u plućima (Yang i sur., 2000). Izoforma  $\Delta Np73$  je zbog svojih protuapoptotskih svojstava veoma važna u razvoju mozga i zajedno s proapoptotskim djelovanjem proteina p53 sudjeluje u pravilnom razvoju moždanih struktura (Pozniak i sur., 2000).

Transgenični miševi kojima nedostaju sve izoforme p73 također pokazuju nepotpune razvojne obrasce poput hipokampalne disgeneze, hidrocefalusa, kao i značajnu manjkavost imunološkog odgovora, kronične infekcije i upale (Yang i sur., 2000). Takvi miševi ne pokazuju povećanu sklonost razvoju tumora (Yang i sur., 2000) što je dovelo do zaključka da protein p73 igra važnu ulogu u razvoju živčanog i osjetilnog sustava, kontroli homeostaze, a manju kao tumor supresor.

Međutim, kasnije je pronađeno da delecijom gena za izoformu TAp73 kod transgeničnih miševa dolazi do bržeg nastanka spontanijih tumora nakon djelovanja karcinogena, neplodnosti, ubrzanog starenja i hipokampalne disgeneze. Povećana je genomska nestabilnost i češće dolazi do aneuploidije što dokazuje tumor-supresorsku ulogu izoforme TAp73 i ulogu u održavanju genomske stabilnosti (Tomasini i sur., 2008). Nadalje, nedostatak izoforme  $\Delta Np73$  dovodi do neurodegeneracije, povećane osjetljivosti na agense koji oštećuju DNA i povećan stupanj apoptoze (Wilhelm i sur., 2010).

U različitim tumorima nađena je viša razina ekspresije proteina p73 (neuroblastom, tumor pluća, debelog crijeva, dojki, mjehura, jetre, jajnika) nego u tkivima iz kojih potječu, što upućuje na lošiju prognozu za bolesnika. Naime, i TAp73 i  $\Delta$ Np73 prekomjerno su eksprimirani u mnogim tumorima (Concin i sur., 2004; Zaika i sur., 2002). Zapravo, promjene ravnoteže između ekspresije izoformi p73 često su obilježje tumora. Prvenstveno su u tumorima pojačano eksprimirane dominantno-negativne izoforme  $\Delta$ Np73 koje funkcionalno inhibiraju izoforme TAp73 (Slade i sur., 2010, 2011).

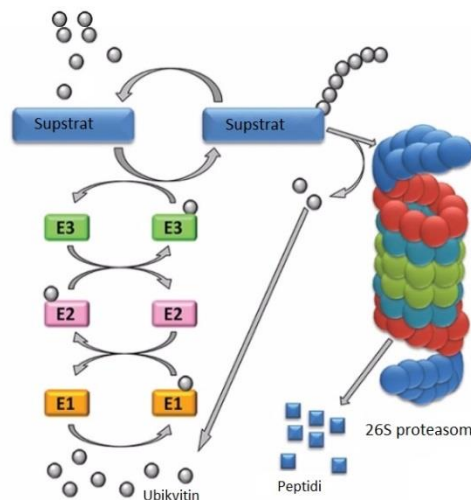
## **1.8 Aktivnost proteinske porodice p53 reguliraju posttranslacijske modifikacije**

Osim što geni *TP53*, *TP63* i *TP73* kodiraju za izoforme različitih, često suprotnih, funkcija, te se međusobno reguliraju, na njihovu aktivnost utječu i različite posttranslacijske modifikacije kojima su podložni. Primjer je odgovor na stanični stres kada dolazi do fosforilacije, odnosno vezanja fosfatne skupine na Tyr-99 i Ser-47 izoforme TAp73 kinazama c-Abl i Chk1 čime započinje apoptoza ovisna o proteinu p73 (Agami i sur., 1999; Gonzalez i sur., 2003). U istom staničnom putu dolazi i do acetilacije, odnosno dodavanja acetilne skupine proteinom p300 (Mantovani i sur., 2004) što dovodi do stabilizacije izoforme TAp73 i povećane proapoptotske aktivnosti. Do fosforilacije izoformi  $\Delta$ Np63 i  $\Delta$ Np73, odnosno potiskivanja njihove aktivnosti odvođenjem iz jezgre dolazi u uvjetima staničnog stresa (Westfall i sur., 2005). Još jedan od načina regulacije je i vezanje malog proteina sličnog ubikvitinu, SUMO-1, odnosno sumoilacija. Sumoilacija izoformi p63 $\alpha$  i p73 $\alpha$  dovodi do smanjenja njihove transkripcijske aktivnosti (Minty i sur., 2000; Ghioni i sur., 2005), ali je njihov udio u stanici vrlo mali pa nema utjecaja na ukupnu aktivnost tih proteina (Blandino i Dobbstein, 2004). Osim navedenih posttranslacijskih dorada, česta je ubikvitinacija koja omogućuje regulaciju količine proteina usmjeravanjem za degradaciju.

### **1.8.1 Ubikvitinske ligaze**

Ubikvitinacija je posttranslacijska modifikacija koja podrazumijeva kovalentno vezanje proteina ubikvitina za željeni protein što ga usmjerava na razgradnju u proteasomu. Kaskada započinje univerzalnim enzimom koji aktivira ubikvitin, E1, koji koristi ATP za prijenos ubikvitina na enzime konjugirane s ubikvitinom, E2 (od engl. *ubiquitin-conjugating enzyme*). Ubikvitinske ligaze E2 stvaraju tioesterske veze s ubikvitinom i prenose ga na ubikvitinske

ligaze E3. Ubikvitinske ligaze mogu varirati strukturom i proteinskim slijedom što omogućuje specifičnost za ciljne proteine sa zajedničkim obilježjima. Takva strukturna varijabilnost omogućuje različite načine djelovanja, poput mono- ili poliubikvitinacije, mogu zahtijevati i drugačije posttranslacijske modifikacije poput fosforilacije ili hidroksilacije što omogućuje preciznu vremensku i prostornu regulaciju uklanjanja određenih proteina. Najznačajnija uloga E3 ligaza je regulacija poliubikvitinacije, odnosno uklanjanja ciljnog proteina (Slika 8). Važnu ulogu ima i monoubikvitinacija čija je uloga neovisna o degradaciji, s obzirom na to da taj mehanizam služi kao mehanizam za regulaciju različitih procesa poput endocitoze površinskih receptora, popravka DNA i regulacije transkripcije ciljnih proteina. Također, mnoge ubikvitinske ligaze E3 imaju sposobnost samoubikvitinacije, odnosno mogu biti samoregulirajuće i potaknuti samouništenje kako bi zaštitile integritet stanice ako njihova koncentracija u stanici postane previsoka (Ardley i Robinson, 2005).



**Slika 8. Mehanizam razgradnje proteina putem sustava ubikvitin-proteasom.** Enzim koji aktivira ubikvitin, E1, prenosi ubikvitin na enzim konjugiran s ubikvitinom, E2, zatim na ubikvitinsku ligazu E3. Visoko specifične E3 ubikvitinske ligaze prenose ubikvitin na supstrat – protein koji se usmjerava za razgradnju putem proteasoma. (Preuzeto i prilagođeno: Massaly i sur., 2014)

Postoje tri skupine E3-ligaza s obzirom na područja koja sadrže; ligaze s RING-područjem, ligaze s područjem sličnim RING-području, tzv. *U-box* ligaze i ligaze s HECT-područjem. Ubikvitinske ligaze s HECT-područjem (od engl. *homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) sadrže središnji cisteinski ostatak koji služi kao primatelj za ubikvitin. Stvara se tioesterska veza između tiolne skupine cisteina i karboksilne skupine glicina s C-kraja što omogućuje prijenos ubikvitina, dok područje na N-kraju ima ulogu u vezanju supstrata. Svima je zajednička proteinska struktura koja se sastoji od područja WW pomoću

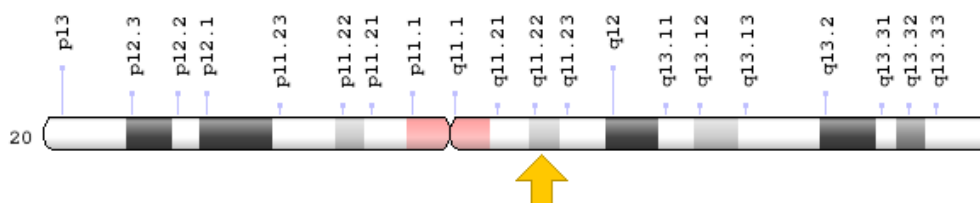
kojeg se stvaraju interakcije sa supstratima koji posjeduju slijed bogat prolinom, PR (od engl. *proline-rich motif*) koje je važno regulatorno područje (Kay i sur., 2000).

### 1.8.2 Ubikvitinska ligaza MDM2

Protein p53 je kao transkripcijski faktor u stanicama u normalnim uvjetima prisutan u niskim koncentracijama te mu je životni vijek vrlo kratak što je posljedica ciljane degradacije. U trenutku pojave stresnih uvjeta u stanici, preko kaskade signalnih puteva dolazi do stabilizacije proteina p53, njegovog nakupljanja te aktivacije što može uzrokovati zastoj staničnog ciklusa ili usmjeravanje u apoptozu. Protein koji je odgovoran za održavanje niskih razina proteina p53 u normalnim uvjetima u stanicama je protein MDM2 (od engl. *mouse double minute 2 homolog*). Protein MDM2 kodiran je genom *mdm2* na kromosomu 12q15, sastoji se od 491 aminokiselina, ukupne veličine oko 55 kDa. Pripada skupini ubikvitinskih ligaza E3 koje sadrže RING područje (od engl. *really interesting new gene*) koje je ključno u održavanju njihove funkcije. RING područje sastoji se od 40-60 aminokiselina te u središtu ima cinkove prste, odnosno regiju C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> (sedam cisteina i jedan histidin) koja koordinira dva iona cinka, Zn<sup>+</sup>, što omogućuje vezanje za N-kraj proteina p53. Specifičan je negativni regulator za protein p53, na njega kovalentno veže protein ubikvitin što ga usmjerava za razgradnju u proteasomu. Protein MDM2 ima onkogeni potencijal budući da inhibira djelovanje proteina p53 vezivanjem za transaktivacijsko područje. Proteini p53 i MDM2 se međusobno reguliraju mehanizmom negativne povratne sprege: kao transkripcijski faktor, p53 potiče ekspresiju MDM2, dok protein MDM2 usmjerava protein p53 za degradaciju i u normalnim uvjetima sprečava preuranjenu apoptozu. Osim što ubikvitinira protein p53, ima sposobnost samoubikvitinacije što omogućava još precizniju kontrolu razine proteina p53. U slučaju pojave staničnog stresa dolazi do fosforilacije proteina MDM2 što dovodi do njegove inaktivacije, odnosno stabilizacije i nakupljanja proteina p53 te njegove aktivacije. Osim što se veže i ubikvitinira protein p53, protein MDM2 se veže i na protein p73 no nema sposobnost njegove ubikvitinacije i utjecaja na razinu ekspresije jer nema regije homologne s regijom 92-112 proteina p53 koja je potrebna za njegovo djelovanje (Ongkeko i sur., 1999). Ipak, pokazano je kako utječe na njegovu transkripcijsku aktivnost i može utjecati na staničnu lokalizaciju (Bálint i sur., 1999), dok vezanje za protein p63, s kojim stvara slabije interakcije u odnosu na vezanje za proteine p53 i p73, uzrokuje njegovu stabilizaciju i aktivaciju (Calabro i sur., 2002, Stindt i sur., 2014).

### 1.8.3 Ubikvitinska ligaza ITCH

ITCH (zvan i Itchy) je E3 ubikvitinska ligaza, nazvana još i AIP4 (od engl. *Atrophin-1 Interacting Protein 4*) (Melino i sur., 2008). Gen *Itch* nalazi se na kromosomu 20q11.22 i kodira za 854 aminokiseline koje čine protein relativne molekulske mase od 113 kDa (Slika 9). Protein ITCH je član porodice proteina NEDD4 s HECT područjem. HECT područje prenosi ubikvitin s E2, enzima konjugiranih s ubikvitinom na ciljne proteine koji su predodređeni za degradaciju u lizosomu. Stoga protein ITCH igra važnu ulogu u mnogim staničnim procesima koji uključuju i diferencijaciju limfoidnih i eritroidnih stanica, kao i regulaciju imunološkog odgovora. Mutacije u ovom genu su uzrok sindromskih multisistemskih autoimunih bolesti. Zbog alternativnog prekrajanja postoje različiti transkripti koji kodiraju za različite izoforme.



**Slika 9. Smještaj gena ITCH.** Žuta strelica označava položaj gena koji kodira za protein ITCH. Gen *Itch* se nalazi na kromosomu 20q11.22. (Preuzeto i prolagođeno: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene>)

#### 1.8.3.1 Utjecaj proteina ITCH na protein p63

Protein ITCH i protein p63 normalno su zajedno eksprimirani u zdravoj koži odraslih ljudi, iako postoje razlike u razini ekspresije. Tako je protein p63 jače eksprimiran u bazalnim slojevima epidermisa, a protein ITCH u vanjskim slojevima. Negativnom regulacijom, odnosno ubikvitinacijom proteina p63, ubikvitinska ligaza ITCH ima važnu ulogu u održavanju homeostaze u stanicama epitela (Rossi i sur., 2006).

E3 ubikvitinska ligaza ITCH sadrži WW područja koja se sastoje od 40 aminokiselina i tvore strukturu trolančane antiparalelne  $\beta$ -ploče s dva triptofana. To područje stvara interakcije s proteinom p63, odnosno njegovim regijama bogatih prolinom (Sudol, 1996). Budući da je to područje prisutno i kod izoformi koje sadrže transaktivacijsku domenu (TAp63) i kod izoformi kojima ona nedostaje ( $\Delta$ Np63), protein ITCH može stvarati interakcije, ubikvitinirati i usmjeravati u apoptozu obje izoforme. Zbog strukturnih razlika, odnosno intramolekulskih interakcija koje se javljaju između transaktivacijskog područja i C-kraja proteina i koje ograničavaju vezanje za protein ITCH, interakcije su izraženije kod izoformi  $\Delta$ N kojima transaktivacijsko područje nedostaje (Serber i sur., 2002). Bez obzira na to, pokazano je da ITCH može ubikvitinirati obje izoforme (Rossi i sur., 2006).

### **1.8.3.2 Utjecaj proteina ITCH na protein p73**

Opisano je nekoliko mehanizama kojima se reguliraju koncentracije proteina p73, od kojih su dva koja smanjuju njegovu transkripcijsku aktivnost. Oba mehanizma uključuju djelovanje ubikvitinskih ligaza; jedan put za razgradnju uključuje nedilaciju, odnosno vezanje proteina sličnog ubikvitinu, NEDD8 na proteine ciljane za razgradnju, dok drugi uključuje djelovanje proteina ITCH, prethodno opisane ubikvitinske ligaze E3 s područjem HECT. Kao i kod proteina p63, u normalnim uvjetima ubikvitinska ligaza ITCH održava koncentracije proteina p73 niskima vezujući na njega ubikvitin i usmjeravajući ga za razgradnju u proteasomu. Budući da se veže na regije bogate prolinom, regulacija razine p73 je ograničena samo na izoforme p73 $\alpha$  i p73 $\beta$ . Kraćim izoformama p73 $\gamma$  i p73 $\delta$ , kao i proteinu p53 nedostaje ta regija pa je onemogućena njihova ubikvitinacija pomoću proteina ITCH (Oberst i sur., 2005). Također, protein ITCH može regulirati razinu izoforme TAp73, kao i izoforme kojoj nedostaje transaktivacijska domena na N-kraju,  $\Delta$ Np73, jer, kao što je već rečeno, regije bogate prolinom koje omogućuju ubikvitinaciju nalaze se na C-kraju.

U normalnim fiziološkim uvjetima protein ITCH glavni je regulator razine proteina p73 u stanicama, slično kao što ubikvitinska ligaza MDM2 održava razine proteina p53 niskima. Međutim, u uvjetima stresa, odnosno oštećenja DNA, dolazi do nagle razgradnje, odnosno smanjenja aktivnosti proteina ITCH još nepoznatim mehanizmom što omogućuje nakupljanje i aktivaciju izoforme TAp73 kao odgovor na stresne uvjete. Aktivirana izoforma TAp73 djeluje tumor-supresorski te može utjecati na zastoj staničnog ciklusa i poticanje apoptoze (Oberst i sur., 2005). Također, iako u stresnim uvjetima dolazi do degradacije proteina ITCH te bi se razine i TAp73 i  $\Delta$ Np73 trebale povećati, dolazi do razgradnje izoforme  $\Delta$ Np73. Time prestaje dominantno-negativan utjecaj  $\Delta$ Np73 na TAp73 te se omogućuje njena proapoptotska aktivnost (Maisse i sur., 2004). Ta činjenica ukazuje na to da je razgradnja izoforme  $\Delta$ Np73 neovisna o proteinu ITCH te dolazi do specifične razgradnje ove izoforme drugim putem koji još nije razjašnjen (Rossi i sur., 2005). Dakle, ubikvitinska ligaza ITCH održava niske razine proteina p73 u normalnim uvjetima kako ne bi došlo do preuranjene apoptoze.



## 1.9 Cilj istraživanja

Članovi proteinske porodice p53 imaju važnu ulogu u obrani stanice od zloćudne transformacije. Između određenih mutiranih oblika proteina p53 i izoformi proteina p63 i p73 dolazi do stvaranja kompleksa što smanjuje transkripcijsku aktivnost protuonkogenih izoformi čime stanica dobiva veći metastatski i onkogeni potencijal. Količine pojedinih proteina obitelji p53 su regulirane ubikvitin ligazama MDM2 (za p53) i ITCH (p63 i p73). ITCH je E-3 ubikvitinska ligaza koja veže izoforme proteina koje sadrže regiju bogatu prolinom ( $\alpha$  i  $\beta$ ) te ih ubikvitinira i usmjerava u razgradnju. Koristit će se dvije forme proteina ITCH: divlji tip proteina s intaktnom funkcijom i forma ITCH (C830A) s mutacijom u HECT domeni koja onemogućava vezanje ubikvitina te je kao takva inaktivna.

Cilj ovog diplomskog rada je potvrditi vezivanje egzogenih proteina p63 i p73 za E3 ubikvitinsku ligazu ITCH te vezivanje egzogenih proteina p73 i p63 za mutirani endogeni p53R248W. Nadalje, cilj je ispitati utjecaj proteina ITCH na vezivanje endogenog mutiranog p53 za egzogene izoforme proteina p63 i p73 (TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ ). Time se želi utvrditi može li protein ITCH spriječiti inhibicijski učinak mutiranog proteina p53 na proteine p63 i p73 ili pak formirati trimerni kompleks kako bi se snažnije inhibirala funkcija proteina p63/p73.

## 2 MATERIJALI I METODE

U istraživanju sam koristila dvije stanične i jednu bakterijsku kulturu.

### 2.1.1 Stanične kulture

- **H1299** (ATCC<sup>®</sup> broj: CRL-5803<sup>™</sup>, oznaka: NCI-H1299 [H1299]) – stanice metastaza karcinoma pluća malih stanica u limfnom čvoru. To su epitelne adherentne stanice s djelomičnom delecijom gena *TP53*, pa se on u tim stanicama ne eksprimira.
- **RD** (ATCC<sup>®</sup> broj: CCL-136<sup>™</sup>) – stanice embrionalnog rabdiosarkoma iz mišića. To su adherentne stanice s mutacijom gena *TP53* (742 C>T, R248W)

### 2.1.2 Bakterijska kultura

- **Mach1** (puno ime: *One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup> T1<sup>R</sup> Electrocompetent cells*, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD) – brzorastući elektrokompetentni soj bakterije *Escherichia coli*, koji ne sadrži rezistenciju na antibiotike.

### 2.1.3 Plazmidni vektori

- *pcDNA3* ugrađenom cDNA gena *ITCH<sup>wt</sup>*, odnosno *ITCH<sup>mut</sup>*. Na gen *ITCH* dodan je biljeg *c-MYC*. *c-MYC* je polipeptid od 10 aminokiselina izveden od gena *c-MYC*. Takav fuzijski gen omogućuje prepoznavanje proteina ITCH pomoću protutijela specifičnih ta taj privjesak. *ITCH<sup>mut</sup>* nosi mutaciju C830A koja onemogućuje vezanje ubikvitina što ga čini funkcionalno inaktivnim
- *pcDNA3* s ugrađenom cDNA gena *TP63* (TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ) odnosno *TP73* (TAp73 $\beta$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$ )
- *pEGFP* s ugrađenom cDNA za fluorescentni protein, GFP

## 2.2 Metode

### 2.2.1 Rad s bakterijskim kulturama

#### 2.2.1.1 Umnažanje elektrokompetentnih bakterija

Kompetentne bakterijske stanice obrađene su tako da mogu prihvatiti stranu plazmidnu DNA. Koristila sam elektrokompetentne bakterijske stanice soja Mach1 koje se pohranjuju u mikroepiuvetama u alikvotima od 50  $\mu$ L s dodatkom 10% glicerola (Kemika, Hrvatska) pri -80°C. Prilikom njihova umnažanja bakterijske stanice se prenesu u Erlenmayerovu tikvicu sa 100 mL svježe tekuće hranjive podloge LB (20 g/L, Sigma Aldrich, SAD) bez antibiotika koja se koristi za uzgoj bakterija. Bakterije se inkubiraju u mediju preko noći pri 37°C na tresilici u vodenoj kupelji (*Unimax 1010*, Heidolph, Njemačka) koja omogućuje stalnu aeraciju i pospješuje rast bakterijske kulture. Sljedećeg dana spektrofotometrijski (*NanoPhotometer<sup>®</sup> N60*, Implen, Njemačka) sam pratila apsorbanciju bakterijske kulture pri 600 nm budući da povećanje stanične mase u kulturi prati povećanje apsorbancije na spektrofotometru. Kada vrijednost apsorbancije dostigne 0,45-0,5 znači da je kultura dospjela u eksponencijalnu fazu rasta i tada se prekine njihovo umnažanje tako da se bakterije preliju u sterilne hladne epruvete od 50 mL i inkubiraju 15 minuta na ledu kako bi se zaustavio njihov rast. Slijede dvije serije centrifugiranja (10 minuta, pri 2000 g i 4°C) i ispiranja s 50 mL hladne redestilirane vode. Nakon centrifugiranja i ispiranja s vodom, slijedi ispiranje s 10%-tnim glicerolom te inkubacija tijekom 20 minuta na ledu nakon čega opet slijedi centrifugiranje. Talog je otopljen u 10%-tnom glicerolu, alikvotiran u mikroepiuvete po 50  $\mu$ L i pohranjen pri -80°C.

#### 2.2.1.2 Transformacija bakterija plazmidom

Transformacija je postupak unošenja plazmidne DNA u bakteriju koja je pripremljena kako bi primila željeni plazmid. Koristila sam unaprijed pripremljene, elektrokompetentne bakterijske stanice soja Mach1 koje se čuvaju pri -80°C. Plazmide sam unosila u bakterijske stanice elektroporacijom, odnosno djelovanjem električnog impulsa napona 1800-3000 V na bakterijske stanice tijekom nekoliko milisekundi. Na taj način se povećava propusnost plazmatske membrane i dolazi do stvaranja pora na membrani te se omogućuje ulazak DNA. Elektroporacija se izvodi u staklenim kivetama od 2 mm koje su prethodno sterilizirane i ohlađene na ledu. U kivete se dodaje 50  $\mu$ L elektrokompetentnih bakterija i 500 pg plazmida te se lupkanjem sadržaj spusti na dno kivete. Suhu kivetu se zatim smjesti u uređaj za elektroporaciju, te se proces elektroporacije odvija pri 2500 V, 25  $\mu$ F i 200  $\Omega$ , tijekom 5 ms. Nakon elektroporacije u kivetu se odmah dodaje 1 mL tekuće hranjive podloge LB, sadržaj se

premjesti u sterilnu mikroeprevetu i inkubira tijekom 1 h pri 37°C kako bi se bakterije oporavile. Sadržaj mikroeprevete (50 µL) se zatim nanosi na Petrijeve ploče s krutom hranjivom podlogom LB i odgovarajućim antibiotikom, ampicilinom (Pliva, Hrvatska), te se inkubira preko noći pri 37°C. Na podlozi rastu samo transformirane bakterijske kolonije budući da plazmid nosi rezistenciju na antibiotik.

### **2.2.1.3 Odabir kolonije i umnažanje transformiranih bakterija**

Na krutoj hranjivoj podlozi LB (LB, 20 g/L, Sigma Aldrich, SAD, agar, 13 g/L Merck, SAD) s ampicilinom (100 µg/mL) rastu samo bakterijske kolonije s plazmidom zbog rezistencije koju nosi plazmid. Sterilnim nastavkom za automatsku pipetu inokulira se jedna bakterijska kolonija u 100 mL tekuće hranjive podloge LB s ampicilinom te se inkubira pri 37°C na tresilici, pri 250 rpm, preko noći.

### **2.2.1.4 Izolacija plazmidne DNA iz transformiranih bakterija**

Bakterije s plazmidom koje su rasle u tekućoj hranjivoj podlozi preko noći su zaustavljene u eksponencijalnoj fazi rasta i alikvotirane u plastične epruvete od 50 mL te centrifugirane tijekom 10 minuta pri  $5000 \times g$ , 4°C. Supernatant se baca kako bi se uklonila tekuća hranjiva podloga sa stanica. Bakterijske stanice koje su u talogu, sada su spremne za izolaciju. Plazmidnu DNA iz bakterijskih stanica izolirala sam kompletom za pročišćavanje plazmida s velikim brojem kopija, *NucleoBond® Xtra Midi* (Macherey-Nagel, Njemačka) prema uputama proizvođača. Bakterijski talog prvo se dobro resuspendira u 8 mL pufera za resuspenziju s dodatkom RNaze A te se u suspenziju dodaje 8 mL pufera za lizu, promiješa te inkubira 5 minuta pri sobnoj temperaturi kako bi se razbila stanična membrana. Nakon inkubacije na lizat se dodaje 8 mL pufera za neutralizaciju koji će spriječiti daljnju degradaciju i oštećivanje plazmidne DNA. Suspenzija se zatim izlijeva na pripremljenu kolonu iz kompleta koja je prethodno isprana s 12 mL ekvibracijskog pufera. Kada suspenzija prođe filter-kolonu, filter se dodatno ispire s 5 mL ekvibracijskog pufera, te se uklanja s kolone. Kolona, na kojoj zaostaje plazmid, ispire s 5 mL pufera za ispiranje kako bi se uklonile sve zaostale nečistoće na koloni. Zatim se na kolonu dodaje 5 mL pufera za eluciju s kojim izlazi plazmidna DNA te se eluat skuplja u plastičnu epruvetu od 15 mL. Plazmidna DNA se zatim precipitira s 3,5 mL 2-propanola (Kemika, Hrvatska) te centrifugira pri  $5000 \times g$ , 15 minuta. Supernatant se uklanja, a talog s plazmidnom DNA se ispire s 2 mL 70%-tnog etanola (Kemika, Hrvatska), ponovno centrifugira, supernatant se baca, a talog plazmidne DNA se suši i otapa u 100 µL pufera TE (od engl. *Tris-EDTA buffer solution*: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). UV-

sprektrofotometrom se odredi koncentracija plazmida, a kvaliteta se provjerava elektroforezom u gelu agaroze, uređajem za elektroforezu *Power Pac Basic Power Supply* i *PowerPac 300* (BioRad, SAD).

#### **2.2.1.5 Elektroforeza u agaroznom gelu**

Izoliranu plazmidnu DNA sam provjerila elektroforezom u 0,8% gelu agaroze. Gel je pripremljen otapanjem 0,3 g agaroze (Sigma Aldrich, SAD) u 40 mL pufera TAE (od engl. *Tris-acetate-EDTA*: 40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,6) te je prije polimerizacije dodano 3  $\mu$ L boje *Midori Green* (Bulldog-Bio, SAD) za kasniju vizualizaciju. Na gel se nanosi 40  $\mu$ g plazmidne DNA kojoj se dodaje 1  $\mu$ L boje Orange G (Sigma Aldrich, SAD) koja služi za praćenje tijekom elektroforeze. Kao standard za određivanje molekulske mase sam koristila *1 Kb Plus DNA Ladder*, raspona 0,1-12 kb (Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza se odvija u puferu TAE, pri naponu od 50 V, tijekom 60 minuta te se po završetku analizira na uređaju za vizualizaciju *Alliance 4.7* (UVitec, Velika Britanija).

### **2.2.2 Rad sa staničnim kulturama**

#### **2.2.2.1 Uzgoj stanica**

Stanice metastaza karcinoma pluća, H1299 i stanice embrionalnog rabdobiosarkoma, RD su adherentne stanične linije koje sam uzgajala u sterilnim uvjetima, u plastičnim Petrijevim posudicama, veličine 100 mm, u inkubatoru za uzgoj stanica (Iskra, Slovenija). Uvjeti u inkubatoru trebaju biti stalni: temperatura 37°C, atmosfera s 5% CO<sub>2</sub> i velika zasićenost vlagom. Sav laboratorijski pribor, otopine i puferi koji se koriste u radu s kulturom stanica moraju biti sterilni, a rad se odvija u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s radnom površinom koja se dezinficira alkoholom i sterilizira UV-svjetlom. Stanične linije H1299 i RD uzgajala sam u kompletiranoj tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle medium*, Gibco™, SAD) uz dodatak 10% seruma goveđeg fetusa, FBS (od engl. *fetal bovine serum*, Sigma Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich, SAD), 1 mM Na-piruvata, (Gibco™, SAD), 100 jedinica/mL penicilina, (Gibco™, SAD), 100  $\mu$ g/mL streptomicina, (Gibco™, SAD). S obzirom na to da su adherentne, žive stanice prijanjaju za podlogu, dok se mrtve zaokružuju i plutaju u mediju.

### 2.2.2.2 Odmrzavanje stanica

Stanice se zamrzavaju u krioprotektivnom mediju (45% serum, 45% medij, 10% DMSO, dimetil-sulfoksid, Kemika, Hrvatska) u epruветama za zamrzavanje i pohranjuju u tekućem dušiku pri  $-196^{\circ}\text{C}$ . Pri odmrzavanju, stanice se djelomično otope u rukama te, u sterilnim uvjetima, odmah preliju u sterilnu staklenu epruветu u koju sam ranije stavila 5 mL ohlađene kompletne tekuće hranjive podloge, kako bi se spriječio učinak krioprotektanta DMSO koji je toksičan za stanice. Stanice se zatim centrifugiraju tijekom 5 minuta pri  $1500 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , kako bi se uklonio DMSO. Supernatant se odlije, a talog stanica resuspendira u 10 mL svježje tekuće hranjive podloge te se u sterilnim uvjetima prenese u Petrijevu posudu promjera 100 mm, lagano protrese kako bi se stanice jednoliko rasporedile te smjesti u inkubator za uzgoj stanica.

### 2.2.2.3 Održavanje stanica u kulturi

Prije početka rada s kulturama potrebne kemikalije za rad u kulturi, tekuća hranjiva podloga DMEM, fosfatni pufer, PBS (od engl. *phosphate-buffered saline*: 4 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,72 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,12 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{dH}_2\text{O}$  do 500 mL) i tripsin (Sigma Aldrich, SAD), koje se čuvaju pri  $4^{\circ}\text{C}$  je potrebno temperirati na  $37^{\circ}\text{C}$  u vodenoj kupelji kako stanice ne bi bile izlagane nepotrebnom stresu. Na početku rada sa staničnim kulturama prvo je potrebno provjeriti njihovo trenutno stanje, odnosno je li dovoljno samo promijeniti tekuću hranjivu podlogu ako su potrošile hranjive tvari ili ih je potrebno i rasaditi ukoliko su popunile Petrijevu posudicu u kojoj rastu. Ukoliko stanice imaju još prostora za rast na podlozi, dovoljno im je samo promijeniti tekuću hranjivu podlogu svakih nekoliko dana. U tekućoj hranjivoj podlozi postoji indikator pH (fenolno crvenilo) koji ukazuje na njezinu kvalitetu. Ukoliko je tekuća hranjiva podloga počela poprimati žutu boju, znači da se pH smanjio i postao kiseo, odnosno da su stanice potrošile hranjive tvari i da su se počeli nakupljati otpadni produkti metabolizma te je tekuću hranjivu podlogu potrebno zamijeniti. Staklenom pipetom u sterilnim uvjetima ukloni se postojeća tekuća hranjiva podloga te se stanice pažljivo isperu s oko 5 mL prethodno ugrijanog PBS-a kako bi se uklonila sva tekuća hranjiva podloga sa zaostalim produktima metabolizma. Nakon ispiranja, na stanice se stavlja 10 mL nove, kompletirane tekuće hranjive podloge. Ukoliko je stanice potrebno i rasaditi, nakon ispiranja s PBS-om koji uklanja ostatke tekuće hranjive podloge, posebice seruma koji je ujedno i inhibitor tripsina, na stanice se stavlja 1-2 mL tripsina te se inkubira nekoliko minuta pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Tripsin kida adherentne veze između stanica, te između stanica i podloge što rezultira međusobnim odvajanjem stanica od njih samih i od podloge. Ukoliko tripsin djeluje dulje vrijeme na stanice, mogao bi ih oštetiti, stoga se

nakon nekoliko minuta na stanice s tripsinom dodaje 9 mL kompletirane tekuće hranjive podloge DMEM te se sadržaj resuspendira. Ovisno o potrebama pokusa, stanice se mogu razrijediti zadržavanjem samo manjeg dijela volumena u postojećoj Petrijevoj posudici. Nakon što se razdijeli željena količina stanica, potrebno je dopuniti posudu s odgovarajućim volumenom tekuće hranjive podloge DMEM.

#### **2.2.2.4 Priprema stanica za transfekciju**

Stanice sam u kulturi održavala u Petrijevim posudicama promjera 100 mm. Za transfekciju, stanice sam rasađivala u manje Petrijeve posude, promjera 60 mm. Nakon tretmana tripsinom, stanice u konfluentnoj Petrijevoj posudi ravnomjerno se raspodijele u četiri Petrijeve posude promjera 60 mm te se nadopune kompletiranom tekućom hranjivom podlogom DMEM do konačnog volumena od 5 mL. Sljedećeg dana stanice postaju 80-90% konfluentne i spremne su za transfekciju.

#### **2.2.3 Prolazna transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA**

Prolazna transfekcija stanica je unos plazmidne DNA u stanicu, ali za razliku od stabilne, plazmid se ne ugrađuje u genom stanice. Prolazna transfekcija omogućuje nakupljanje velike količine željenog proteina zbog prekomjerne ekspresije unesene plazmidne DNA. Najčešće korišteni načini transfekcije su transfekcija kalcijevim fosfatom i lipofekcija. Lipofekcija je učinkovitija i reproducibilnija metoda, a sastoji se od unosa plazmidne DNA omotane u liposome koji se stapaju sa staničnom membranom te je na takav način omogućen njen ulazak u stanicu. Za potrebe pokusa koristila sam komplet za lipofekciju *Lipofectamine*<sup>®</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific, SAD) kao i preporučeni protokol za transfekciju.

Kako bih ispitala je li metoda unosa plazmidne DNA dovoljno učinkovita na mojim staničnim linijama, stanice su nasađene na Petrijeve ploče s pokrovnim stakalcima koja su prethodno sterilizirana. Kada su stanice postale konfluentne, odnosno prekrile pokrovna stakalca, na stanice sam nanosila reagens *Lipofectamine* 2000 zajedno s plazmidom pEGFP koji nosi cDNA za fluorescentni protein GFP. Sljedećeg dana, nakon što su stanice primile plazmid i eksprimirale fluorescentni protein GFP, pokrovna stakalca s transfeciranim stanicama su preklopljena na predmetno stakalce i promatrana su na fluorescencijskom mikroskopu. Stanice su prebrojane i određen je postotak transfeciranih stanica.

Stanice su nasađene tako da u trenutku unosa plazmida budu konfluentne, odnosno da površina za rast bude oko 80% popunjena. Za svaku transfekciju su potrebne dvije

mikroeprovete od 1,5 mL u koje se stavlja po 500  $\mu$ L tekuće podloge Opti-MEM (Gibco™, SAD). U jednu mikroeprovetu dodaje se 18  $\mu$ L reagensa *Lipofectamine 2000*, a u drugu ukupno 8  $\mu$ g željenog plazmida ili kombinacije plazmida (Tablica 3.). Sadržaj mikroeprove inkubira se tijekom 5 minuta pri sobnoj temperaturi te se nakon toga sadržaji pomiješaju i inkubiraju 20 minuta kako bi se stvorile lipidne micle s plazmidnom DNA. Stanicama koje će se transfecirati za to se vrijeme ukloni tekuća hranjiva podloga te se zamijeni djelomično kompletiranom tekućom hranjivom podlogom koja ne sadrži antibiotike (hranjiva podloga DMEM s dodatkom 10% seruma goveđeg fetusa, 2 mM L-glutamina, 1 mM Na-piruvata). Nakon inkubacije, sadržaj mikroeprove lagano se ispusti na stanice i inkubira jedan dan u inkubatoru za uzgoj stanica. Sljedećeg dana stanice su transfecirane, sadrže plazmid i proteine te su spremne za daljnje pokuse.

Tablica 3. Kombinacije i količine plazmida za pojedini pokus. Količina ukupne DNA je bila 8  $\mu$ g po jedinici transfekcije.

Pokus	Stanična linija	Kombinacije i količine plazmida			
1	RD	8 $\mu$ g pcDNA-GFP			
	H1299	8 $\mu$ g pcDNA-GFP			
2	H1299	4 $\mu$ g pcDNA3 + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$
3	RD	4 $\mu$ g pcDNA3 + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$
4	H1299	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$
5	H1299	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$
6	RD	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$
7	RD	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>wt</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$
8	RD	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$
9	RD	4 $\mu$ g pcDNA3 + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np63 $\alpha$
10	RD	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA-TAp73 $\beta$	4 $\mu$ g pcDNA3+ 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$	4 $\mu$ g pcDNA-Itch <sup>mut</sup> + 4 $\mu$ g pcDNA- $\Delta$ Np73 $\alpha$



#### 2.2.4 Izolacija proteina iz transfeciranih stanica za koimunoprecipitaciju

Dan nakon transfekcije stanice imaju prekomjerno eksprimirane željene proteine. Cijeli postupak izolacije proteina se odvija na ledu. Stanice se odvoje od podloge strugalicom, te se suspenziju prelije u plastičnu epruvetu od 15 mL. Petrijeva posuda se potom ispiri s 3 mL hladnog PBS-a i prebaci u istu epruvetu kako bi se pokupile dodatne zaostale stanice. Epruvete sa stanicama se centrifugira tijekom 5 minuta pri 1500 rpm i 4 °C. Supernatant se ukloni, a talog stanica resuspendira u 100 µL otopine pufera TENN s koktelom inhibitora proteaza *Complete Mini EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Sigma Aldrich, SAD) i prebaci u mikroepruvetu od 1,5 mL. Uzorke sam sonicirala ultrazvučnim sonikatorom, *Labsonic® M* (B. Brown Biotech International, Sartorius Group, SAD), 2 × 10 sekundi pomoću ultrazvučne sonde promjera 1 mm, amplitudom 80, kako bi se razbile stanične membrane i oslobodili proteini. Zatim se uzorci centrifugiraju tijekom 20 minuta pri 13 000 rpm i 4°C. Supernatant u kojemu su proteini, prebace se u novu mikroepruvetu, nakon čega sam određivala koncentraciju proteina.

#### 2.2.5 Određivanje koncentracije proteina metodom BCA

Metoda BCA (od engl. *bicinchoninic acid assay*) je metoda za određivanje ukupne koncentracije svih proteina u uzorku, a temelji se na činjenici da dvovalentni ioni bakra u lužnatim uvjet ima tvore komplekse s peptidnim vezama i reduciraju se u monovalentne ione,  $\text{Cu}^+$  koji reagiraju s bicinkoničnom kiselinom pa nastane produkt ljubičaste boje koji se sastoji od dvije molekule BCA i iona bakra,  $\text{Cu}^+$ . Kompleks koji nastaje topljiv je u vodi i pokazuje snažnu apsorbanciju na 570 nm što omogućuje spektrofotometrijsku detekciju. Izmjerena apsorbancija je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku zbog toga što je broj peptidnih veza, odnosno količina proteina, najvažniji čimbenik za nastajanje obojanog produkta. Koncentracija proteina određuje se prema standardnim otopinama, a ja sam koristila razrjeđenja albumina iz goveđeg seruma, BSA (od engl. *bovine serum albumine*). Za mjerenje koncentracije koristila sam *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, SAD) i standardne otopine proteina albumina iz goveđeg seruma, BSA (od engl. *bovine serum albumine*) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/mL koje su dobivene serijskim razrjeđivanjem matične otopine koncentracije 2,0 mg/mL u redestiliranoj vodi. Otopine se nanose na plastične mikrotitarske pločice s 96 bunarića. Zatim se nanosi redestilirana voda kao negativna kontrola te po 20 µL uzorka koji se nanose u duplikatima i koji su 10 × razrijeđeni destiliranom vodom (nanosi se 2 µL uzorka i 18 µL redestilirane vode). Zatim se u svaki

bunarić doda 200  $\mu$ L reagensa za određivanje koncentracije *BCA Protein Assay Kit* pripremljenog miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1. Pločica se tada promiješa na tresilici za mikrotitarske pločice oko jedne minute te se inkubira tijekom 30 minuta pri 37°C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, pločica se ohladi na sobnu temperaturu te se očita apsorbancija pri 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica *ELISA* (Multiscan MS Labsystems, Finska). Iz očitanih apsorbancija otopina albumina izradi se baždarna krivulja iz koje se zatim računaju koncentracije proteina u uzorcima, imajući na umu da su bili prethodno razrijeđeni deset puta.

## 2.2.6 Koimunoprecipitacija

Imunoprecipitacija je metoda koja omogućuje izdvajanje proteina od interesa iz ukupnih proteina pomoću specifičnog antitijela s kojim stvara kompleks. Za istraživanje interakcija između dva ili više proteina, koristi se metoda koimunoprecipitacije. Metoda se temelji na činjenici da se ciljni protein, koji može biti u kompleksu s drugim proteinima, veže sa specifičnim antitijelom i izdvaja iz staničnog lizata. Proteini postojećeg kompleksa se kasnije analiziraju metodom *Western blot* korištenjem specifičnih antitijela.

### 2.2.6.1 Koimunoprecipitacija pomoću agaroznih kuglica specifičnih za c-MYC

Korištenje anti-c-MYC agaroze, odnosno agaroznih zrnca obloženih proteinom G i konjugiranih antitijelom anti-c-MYC (Thermo Fisher Scientific, SAD) omogućeno je zbog činjenice da je protein od interesa zapravo rekombinantni protein koji nosi privjesak c-MYC. Na agarozu je kovalentno vezano antitijelo anti-c-MYC koje će s privjeskom c-MYC stvarati interakciju antigen-antitijelo te će se moći imunoprecipitirati željeni protein s privjeskom c-MYC.

Prvo je potrebno pripremiti anti-c-MYC-agarozu prema uputama proizvođača, na način da se u mikroeprevetu stavlja 40  $\mu$ L dobro izmiješane suspenzije agaroze. Slijedi serija ispiranja s puferom TENN (5 mL 1M Tris, pH 7,5; 1 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0; 0,5 mL NP-40, 3 ml 5 M NaCl, dH<sub>2</sub>O do 100 mL), 3 ispiranja u volumenu od 1 mL i centrifugiranja 30 sekundi pri 12 000  $\times$  g kako bi se u potpunosti uklonio pufer u kojem je agarozna bila pohranjena (centrifugiranjem se agarozna zrnca talože na dno epruvete te se supernatant pažljivo ukloni). Nakon ispiranja na agarozu se dodaje 400  $\mu$ g ukupnih staničnih proteina, mikroepreveta se nadopunjuje puferom TENN do 200  $\mu$ L, oblaže parafilmom te inkubira preko noći pri 4°C uz stalno rotiranje. Kao kontrolu metode imunoprecipitirala sam MYC-agarozom bez dodatka lizata proteina. Sljedećeg dana uzorci se centrifugiraju 30 sekundi pri 12 000  $\times$  g. Supernatant

je pažljivo odvojen od kuglica i pospremljen za analizu uspješnosti vezanja za kuglice. Talozi uzoraka s agarozom dva puta se ispiru puferom PBS te puferom PBS s 0,05% Tween-20 (Sigma Aldrich, SAD) kako bi se uklonili svi zaostali nevezani proteini. Nakon posljednjeg ispiranja talozi se resuspendiraju u 20  $\mu$ L 2  $\times$  pufera Laemmli za nanošenje uzoraka (1 mL 1 M Tris, pH 6,8; 2 mL 1 M ditioneitol-DTT; 4 mL 10% SDS; 2 mL glicerol; 10 mg bromfenolno plavilo), te potom kuhaju 10 min pri 70°C. Uzorke sam potom nanijela na poliakrilamidni denaturirajući gel i analizirala metodom *Western blot*. Na gel sam nanosila cjelokupni imunoprecipitirani uzorak, po 25  $\mu$ L supernatanta izdvojenog tijekom imunoprecipitacije i po 25  $\mu$ g staničnog lizata.

### **2.2.6.2 Koimunoprecipitacija upotrebom magnetskih zrnaca DynaBeads™ Protein G**

*DynaBeads Protein G* su magnetska zrnca promjera 2,8  $\mu$ m s kovalentno vezanim rekombinantnim proteinom G (Thermo Fisher Scientific, SAD). Dodavanjem specifičnog antitijela u suspenziju zrnaca antitijelo se veže za protein G svojim Fc područjem te je nakon inkubacije s proteinima protein preko antitijela i proteina G vezan za magnetsku kuglicu.

Prvi korak se sastoji od pripreme zrnaca kako bi se moglo vezati specifično antitijelo. 50  $\mu$ L dobro resuspendiranih magnetskih zrnaca stavlja se u mikroeprevetu od 2 mL te zatim na magnetski držač *DynaMag 2* (magnetska zrnca se skupljaju uz stijenku epruvete koja je najbliže magnetskom držaču). Supernatant se uklanja, a zrnca se dva puta ispiru s 200  $\mu$ L pufera *Wash & Bind* (0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,01% Tween-20, pH 9,0). Slijedi inkubacija tako pripremljenih magnetskih zrnaca s 2  $\mu$ g specifičnog antitijela u 200  $\mu$ L pufera *Wash & Bind* tijekom sat vremena uz stalno rotiranje pri sobnoj temperaturi. Ja sam koristila monoklonalno antitijelo anti-p53 klon DO1 (mišje, preporučene radne koncentracije 1:1000, Santa Cruz Biotechnologies, SAD). Nakon što su se antitijela vezala za magnetska zrnca, mikroepreveta se postavlja na magnetski držač, uklanja se supernatant, a zrnca s vezanim antitijelom se ispiru s 200  $\mu$ L pufera *Wash & Bind*. Na kuglice sam tada dodala 400  $\mu$ g ukupnih staničnih proteina i inkubirala uz stalno rotiranje u hladnoj komori pri 4°C preko noći. Kao kontrolu metode imunoprecipitirala sam uzorke ukupnih proteina bez prisutnosti antitijela, te bez prisutnosti proteina.

Sljedećeg dana mikroeprevete se stavljaju na magnet, supernatant se pažljivo odvoji od zrnaca i pohrani za analizu uspješnosti vezanja, dok se magnetska zrnca s vezanim proteinima dva puta ispiru puferom PBS kako bi se uklonili svi zaostali nevezani proteini. Nakon posljednjeg ispiranja talozi su resuspendirani u 20  $\mu$ L 2  $\times$  Laemmli pufera za nanošenje

uzoraka, te su potom kuhani 10 min pri 70°C. Mikroeprovete su stavljene na magnet kako bi se magnetna zrna odvojila od proteina. Uzorci su potom nanoseni na poliakrilamidni denaturirajući gel i analizirani metodom *Western blot*. Na gel sam nanosila cjelokupni imunoprecipitirani uzorak i po 25 µL supernatanta izdvojenog tijekom imunoprecipitacije i po 25 µg staničnog lizata.

### **2.2.7 Analiza metodom „*Western blot*“**

Analiza *Western blot* je metoda koja omogućuje identifikaciju, detekciju i kvantifikaciju proteina u određenom uzorku pomoću specifičnih antitijela. Analiza se temelji na prepoznavanju i stvaranju kompleksa između antitijela i proteina koji se nalazi na sintetskoj membrani. Analiza se sastoji od nekoliko koraka koji uključuju razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, prijenos proteina iz gela na membranu, provjeru uspješnosti prijenosa bojanjem, sprečavanje nespecifičnog vezanja na membranu, vezanje specifičnih primarnih i sekundarnih antitijela te detekciju i vizualizaciju proteina od interesa na membrani.

#### **2.2.7.1 Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida**

Elektroforeza je metoda razdvajanja proteina na temelju njihove veličine i elektroforetske pokretljivosti. Koristila sam metodu denaturirajuće elektroforeze, SDS-PAGE (od engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylate gel electrophoresis*) gdje se u poliakrilamidni gel dodaje natrij dodecil sulfat, SDS (od engl. *sodium dodecyl sulphate*) koji denaturira proteine tako da se jedna molekula SDS-a veže na dvije aminokiseline te maskira njihov naboj svojim snažnim negativnim nabojem, a molekuli daje štapićast oblik. Tako denaturirane molekule imaju konstantan omjer mase i naboja te njihova elektroforetska pokretljivost ovisi isključivo o njihovoj molekularnoj masi.

Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu koju sam koristila, sastoji se od dva gela – gela za sabijanje i gela za razdvajanje uzoraka. Na granici gelova proteini se skupljaju u tankoj liniji što omogućuje njihovo efikasnije razdjeljivanje u gelu za razdvajanje. Gelovi su različitog sastava i pH (Tablica 4.); gornji gel (gel za sabijanje, 5%) nižeg je pH (pH 6,8) i služi za sabijanje uzoraka jer je glicin bliži izoelektričnom obliku te dolazi do lokalnog pada vodljivosti i porasta razlike potencijala pa se proteini ubrzavaju. Donji gel (gel za razdvajanje, 7%) višeg je pH (pH 8,8), glicin je negativno nabijen pa se proteini razdvajaju na temelju svoje molekularne mase.

Tablica 4. Sastav gelova za razdvajanje i sabijanje

Sastojak	Gel za razdvajanje (7%) Volumen/mL	Gel za sabijanje (5%) Volumen/mL
reH <sub>2</sub> O	4,95	2,7
30% otopina AA (30% akrilamid, 7% bisakrilamid, Sigma Aldrich, SAD)	2,35	0,67
1,5 M Tris (pH 8,8, Sigma Aldrich, SAD)	2,5	-
1 M Tris (pH 6,8)	-	0,5
10%-tni SDS (Sigma Aldrich, SAD)	0,1	0,04
10%-tni amonij persulfat, APS (Sigma Aldrich, SAD)	0,1	0,04
N, N, N, N-tetrametiletildiamin (TEMED; Sigma Aldrich, SAD)	0,007	0,004

Postupak pripreme gelova započinje sklapanjem stakalaca koja moraju biti čista i isprana etanolom. Sklapaju se jedno deblje staklo s razmaknicom od 1,5 mm s pokrovnim stakalcem na nosač te se izlijeva prvo gel za razdvajanje. Nakon što gel polimerizira, izlijeva se gel za sabijanje i dodaju se češljici koji će uklanjanjem stvoriti jažice u koje ćemo nanositi uzorke. Nakon što je i gornji gel polimerizirao, uklanjaju se češljici i stakla s gelovima se slažu u aparaturu za elektroforezu. U svim pokusima koristila sam 5%-tni gel za sabijanje i 7%-tni gel za razdvajanje, debljine 1,5 mm s 10 jažica za nanošenje uzoraka.

Uzorke dobivene imunoprecipitacijom analizirala sam SDS-PAGE elektroforezom. Na gel sam nanosila: 25 µg lizata proteina, cijeli imunoprecipitat i 25 µL supernatanta kao provjera učinkovitosti imunoprecipitacije s dodanim određenim volumenom pufera za uzorke, 2 × LB te 3,5 µL standarda za određivanje molekulske mase proteina, *Precision Plus Protein Standards Dual Color*, raspona 10-250 kDa (BioRad, SAD). Za kontrolu koimunoprecipitacije sam koristila uzorke inkubirane bez antitijela, kao i antitijela inkubirana bez uzoraka.

Nakon što se uzorci nanesu na gel, u kadicu se nadolije pufer za elektroforezu te se spaja na uređaj za napajanje. Elektroforeza teče pri konstantnom naponu od 90 V dok uzorci prolaze kroz gel za sabijanje (tijekom 30 minuta) i pri 110 V kad uzorci uđu u gel za

razdvajanje, sve dok boja u puferu za uzorke, bromfenolno plavilo ne izađe iz gela (oko 1-1,5 sat).

### **2.2.7.2 Prijenos proteina na membranu**

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE, uklanja se gornji gel za sabijanje, a proteini se prenose na nitroceluloznu membranu s porama veličine 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore, SAD) izrezanu tako da odgovara dimenzijama gela za razdvajanje (oko  $7 \times 5$  cm). Za prijenos sam koristila tzv. mokri prijenos, gdje se prijenos odvija u puferu za prijenos (18,4 mM Tris-baza, 14 mM glicin, 2% metanol), a proteini elektroforezom izlaze iz gela i vežu se na površinu membrane gdje su onda lako dostupni za interakcije sa specifičnim primarnim antitijelima.

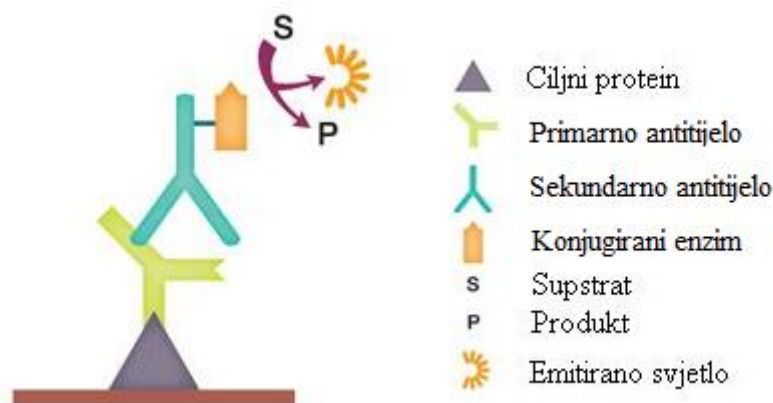
Prijenos se odvija u kadici za elektroforezu u koju se stavljaju kazete u kojima se nalazi gel i membrana. Krećući od dijela kazete bližeg katodi (crni dio kazete), slažu se spužvica, dva filter papira, gel za razdvajanje s proteinima, nitrocelulozna membrana, dva filter papira i spužvica te se zatvara bijelim dijelom kazete pazeći pritom da niti u jednom sloju nema mjehurića koji bi mogli ometati prijenos proteina na membranu. Takva kazeta se stavlja u kadicu za elektroforezu zajedno s puferom za prijenos, posudicom s ledom kako se sustav ne bi pregrijavao, te magnetom. Kadica za transfer smještena je na magnetsku miješalicu kako bi se održavala ujednačena temperatura sustava, a sustav se spoji na izvor napajanja pod uvjetima stalne jakosti struje od 200 mA tijekom 2 sata.

### **2.2.7.3 Analiza proteina**

Nakon prijenosa, sustav za prijenos se rastavlja, a membrana se kratko ispiru u destiliranoj vodi uz zibanje kako bi se oslobodila metanola iz pufera za prijenos. Prvim pogledom na čisto bijelu membranu uočava se dvobojni marker koji služi za određivanje mase proteina što je prva potvrda da je prijenos bio uspješan. Nakon kratkog ispiranja, membrana se inkubira uz zibanje u otopini za bojanje (0,5 g naftolno plavilo, 50 mL metanol, 10 mL octena kiselina, dH<sub>2</sub>O do 500mL). Naftolno plavilo koje nespecifično boji sve proteine. Membrana se zatim ispiru od otopine za bojanje u otopini za odbojavanje (40% metanol, 7% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) kako bi se isprala sva boja koja je vezana za membranu, dok proteini ostaju obojeni i vidljivi kao plave vrpce na svijetloj membrani. Bojenje membrane služi kao potvrda da se proteini nalaze na njoj i da je prijenos uspio, ali i da se procijeni ujednačenost nanošenja uzoraka.

Nakon što sam provjerila jesu li proteini na membrani, membrana se ispiru u puferu TBST (od engl. *Tris-buffered saline Tween*: 15 mM NaCl; 5 mM Tris; 0,5 ml Tween-20, dH<sub>2</sub>O

do 1000 mL) na zibalici kako bi se uklonili ostaci metanola i octene kiseline koji su se nalazili u otopini za odbojavanje. Nakon ispiranja slijedi blokiranje membrane u otopini za blokiranje (5% obrano mlijeko (Dukat, Hrvatska) u puferu TBST) kako bi se proteini iz mlijeka vezali na prazne dijelove membrane i tako spriječili nespecifično vezanje antitijela u daljnjim koracima. Blokiranje se odvijalo tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi uz zibanje. Za to vrijeme se u reagensu za blokiranje razrjeđuju primarna antitijela u odgovarajućim razrjeđenjima. Nakon blokiranja slijedi inkubacija u primarnom antitijelu preko noći pri 4°C na zibalici. Primarno antitijelo za to se vrijeme specifično veže na protein od interesa nakon čega se višak nevezanih primarnih antitijela ispire u puferu TBST tijekom 30 minuta uz zibanje. Ukupni proteini su izolirani iz stanica H1299 i RD te je provedena analiza metodom *Western blot* koristeći specifična antitijela za proteine p63 i p73. Antitijelo anti-p63 $\alpha$  H-129 (kuničje, 1:1000, Santa Cruz Biotechnologies, SAD) veže se na obje izoforme od interesa, TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (Slika 11a) a GC-15 (mišje, 1:500, BD Biosciences, SAD) prepoznaje izoforme p73 $\beta$  (u ovom slučaju TAp73 $\beta$ ) i anti-p73  $\Delta$ 27 (kuničje, 1:2000, dobiveno ljubaznošću dr.sc. B. Vojteška) prepoznaje izoforme  $\Delta$ Np73, odnosno  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (Slika 11b). Kao kontrola preciznosti nanošenja uzoraka koristila sam endogeni protein  $\beta$ -aktin detektiran antitijelom I-19 (kozje, 1:300, Santa Cruz Biotechnologies, SAD). Zatim se membrana inkubira u sekundarnom antitijelu (koje odgovara primarnom) koje je također razrijeđeno u reagensu za blokiranje u odgovarajućoj koncentraciji te se inkubira pri sobnoj temperaturi tijekom 45 minuta uz zibanje kako bi se sekundarna antitijela vezala na primarna. Kao sekundarna antitijela su korišteni kuničje protumišje *Amersham ECL Antimouse IgG, HRP-linked whole antibody* (1:3000, GE HealthCare, UK) za primarna antitijela GC-15 i c-MYC, kozje protukuničje *Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody* (1:3000, Cell Signaling Technology, SAD) za  $\Delta$ 27 i H-129 te magareće protukozje *Amersham ECL anti-goat IgG, HRP-linked whole antibody* (1:3000, Santa Cruz Biotechnologies, SAD) za I-19 Koristila sam sekundarna antitijela na koja je vezan enzim peroksidaza iz hrena koji će omogućiti vizualizaciju (Slika 10). Slijede tri ispiranja membrane u puferu TBST na zibalici.



**Slika 10. Princip detekcije proteina antitijelima u analizi Western blot.** Na protein koji se nalazi na membrani specifično se veže primarno antitijelo. Na fragment Fab primarnog antitijela specifično se veže sekundarno antitijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena, HRP (od engl. *Horseradish peroxidase*) koja djeluje na kemiluminiscentni supstrat. (Preuzeto i prilagođeno: [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com))

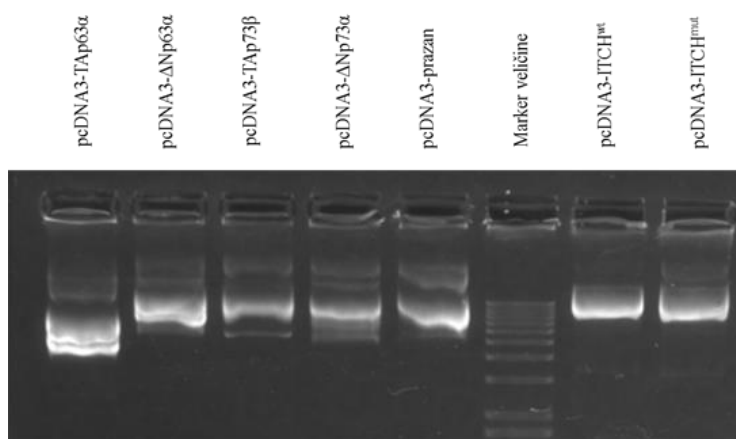
Za detekciju signala na membrani koristila sam supstrat za detekciju proteina kemiluminiscencijom *Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus* (Perkin Elmer, SAD) koji se priprema miješanjem supstrata A (otopina luminola) i B (otopina za oksidaciju) u omjeru 1:1. Inkubacija membrane sa supstratom trajala je jednu minutu u mraku. Dodavanjem supstrata peroksidazi iz hrena dolazi do enzimske reakcije čiji je produkt obojeni talog na mjestu vezanja antitijela, odnosno mjestu gdje se nalazi željeni protein te do emisije svjetla. Signal se detektira na uređaju za vizualizaciju, *Alliance 4.7*.



### 3 REZULTATI

#### 3.1 Provjera plazmida nakon umnažanja u elektrokompetentnim bakterijama

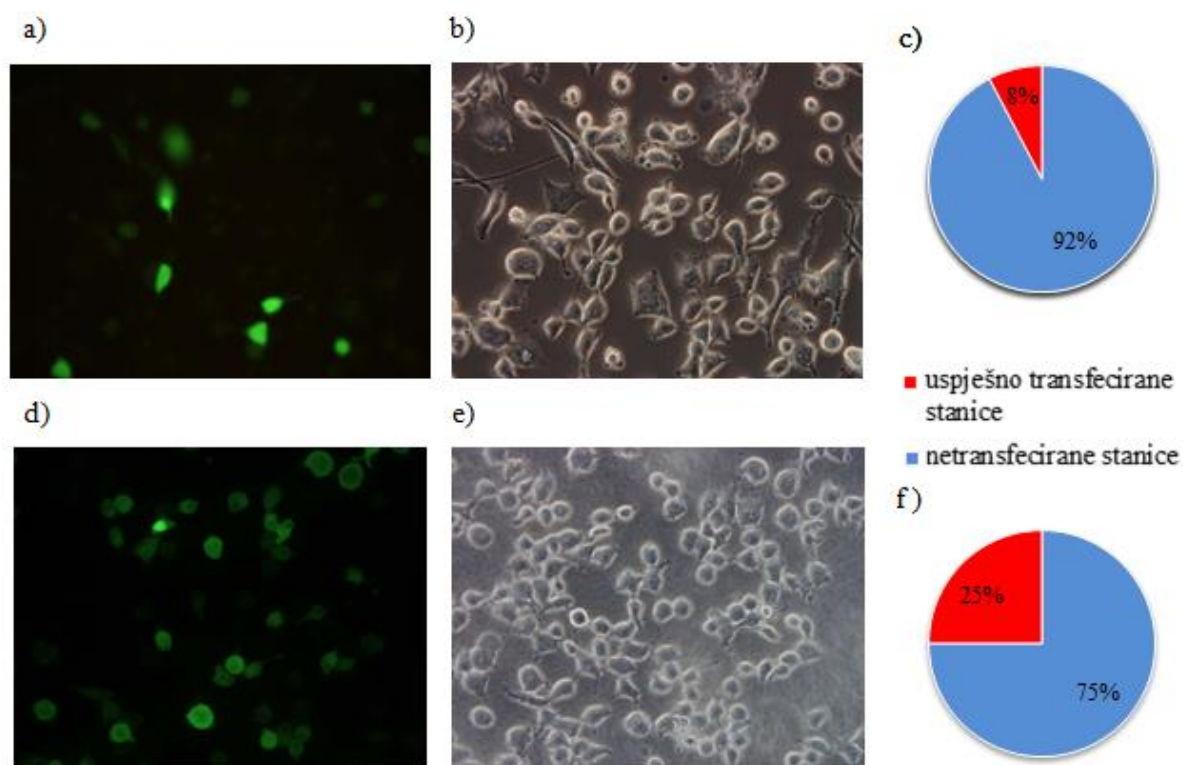
Plazmidi koji nose inserte od interesa umnoženi su u elektrokompetentnim bakterijama te su izolirani po protokolu (poglavlje 3.2.6.). Kvaliteta umnoženih plazmida je provjerena agaroznom gel-elektroforezom u 0,8%-tnom gelu te su uzorci analizirani na uređaju za vizualizaciju *Alliance 4.7* (Slika 11).



Slika 11. Provjera izoliranih plazmida agaroznom gel-elektroforezom.

#### 3.2 Ispitivanje učinkovitosti transfekcije

Kako bi se odredio udio stanica u koje je ušao željeni plazmid, odnosno učinkovitost transfekcije, stanice su transfecirane plazmidom koji sadrži cDNA za GFP, *pEGFP*, opisano u poglavlju 2.2.3. Sljedećeg dana fluorescencijskim mikroskopom je određen udio transfeciranih stanica, odnosno stanica koje eksprimiraju GFP i fluoresciraju zeleno. Slika 12 prikazuje razlike u udjelu transfeciranih stanica među staničnim linijama. Stanična linija H1299 pokazuje bolju učinkovitost transfekcije, odnosno plazmid lakše ulazi u stanice i dolazi do sinteze GFP-a i stanice fluoresciraju zeleno. U stanicama RD je taj događaj osjetno rjeđi, vrlo je mali udio stanica pozitivnih za GFP – ta stanična linija slabije je transfektabilna.

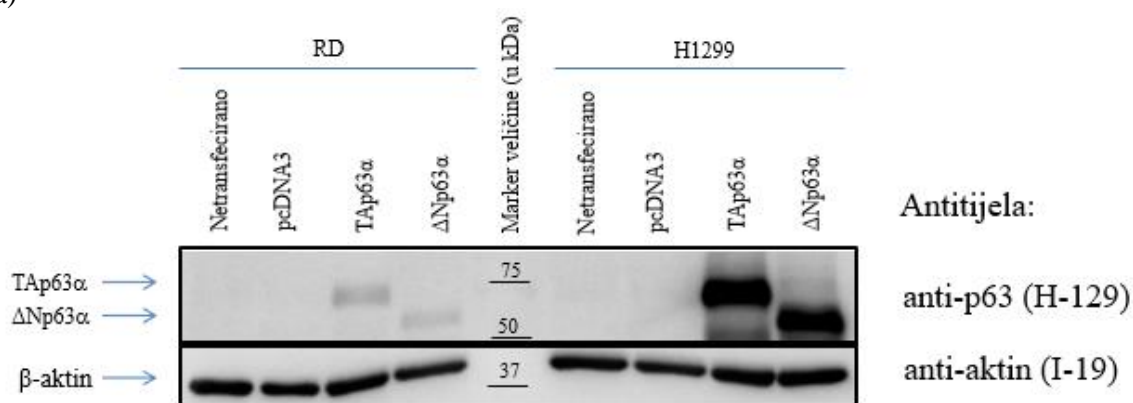


**Slika 12. Usporedba uspješnosti transfekcije staničnih linija RD i H1299.** Slike a) i b) prikazuju staničnu liniju RD, a d) i e) staničnu liniju H1299. Slike a) i d) su slikane fluorescentnim mikroskopom, dok su slike b) i e) svjetlosnim mikroskopom. Graf prikazuje odnos uspješno transfeciranih i netransfeciranih stanica RD (c), i H1299 (f). Povećanje je

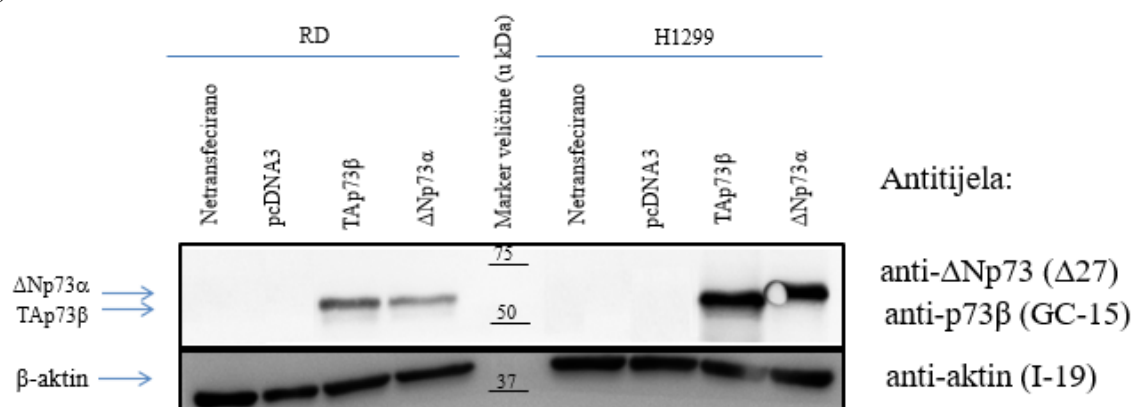
### 3.3 Dokaz egzogene ekspresije proteina p63 i p73

S obzirom na to da se u stanice plazmidom unose geni za proteine od interesa, bilo je potrebno provjeriti razliku u ekspresiji endogenih i egzogenih proteina kako bi se dobio uvid u stanje u stanicama nakon transfekcije u odnosu na stanice koje nisu transfecirane (kontrola), odnosno one koje su transfecirane s plazmidnim vektorom koji ne sadrži insert (pcDNA3). Ukupni proteini su izolirani iz stanica H1299 i RD te je provedena analiza metodom *Western blot* korištenjem specifičnih antitijela za proteine p63 i p73. Antitijelo anti-p63 $\alpha$  H-129, veže se na obje izoforme od interesa, TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (Slika 13a), a antitijelo GC-15 prepoznaje izoforme p73 $\beta$  (u ovom slučaju TAp73 $\beta$ ), dok antitijelo anti-p73  $\Delta$ 27 prepoznaje izoforme  $\Delta$ Np73, odnosno  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (Slika 13b). Kao kontrolu preciznosti nanošenja uzoraka koristila sam endogeni protein  $\beta$ -aktin detektiran antitijelom I-19.

a)



b)



**Slika 13. Kontrola uspješnosti transfekcije.** Stanične linije RD i H1299 transfecirane su reagensom *Lipofectamine 2000* te je provjerena uspješnost transfekcije. Slika a) prikazuje transfekciju proteina p63, dok slika b) prikazuje transfekciju s p73. Kontrole su netransfecirane stanice, kao i stanice transfecirane s praznim plazmidom (pcDNA3)

Iz Slika 13a i 13b vidljivo je kako proteina p63 i p73 u kontroli i stanicama transfeciranim s pcDNA3 nema ili je njihova razina ispod granica detekcije. Dobiveni rezultati ukazuju na to kako je jačina dobivenog signala u transfeciranim stanicama postoji i nedvojbeno je u odnosu na netransfecirane stanice i stanice transfecirane s praznim plazmidom. Također, postoji nedvojbeno razlika u intenzitetu specifičnih vrpca za proteine p63 i p73 gdje je vidljivo da su vrpce izraženije kod stanične linije H1299. To odgovara rezultatima dobivenih kontrolom transfektabilnosti (poglavlje 2.2.3) što dovodi do zaključka da stanične linije nisu jednako transfektabilne te postoji razlika u količini stanica koje su primile plazmid; stanična linija H1299 je bolje transfecirana, više stanica je primilo plazmid i eksprimiralo željeni protein te je u ukupnom lizatu stanica njegova količina veća u odnosu na lizat stanične linije RD.

Nije bilo potrebno provjeravati omjer endogenog i egzogenog proteina ITCH s obzirom na to da egzogeni ITCH sadrži privjesak c-MYC. Naime, protein ITCH je imunoprecipitiran

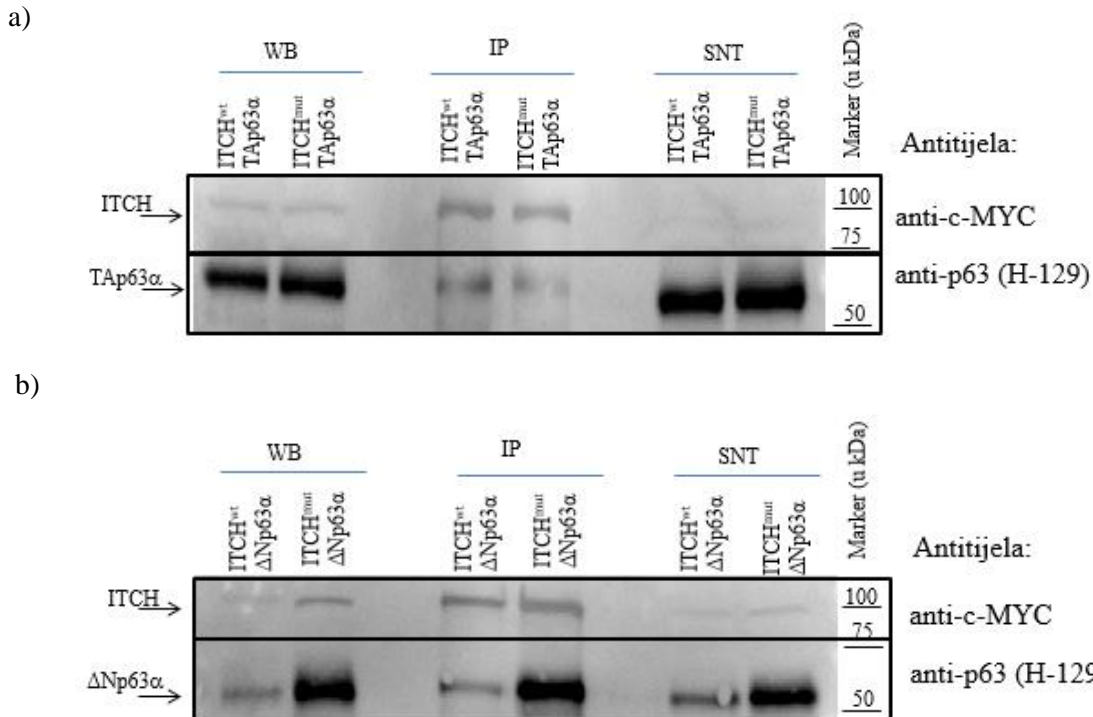
pomoću agaroznih kuglica s vezanim antitijelom anti-c-MYC (mišje, 1:400, Santa Cruz Biotechnologies, SAD) koji se veže na c-MYC privjesak. Rezultat toga je imunoprecipitacija samo egzogenog fuzijskog proteina ITCH-c-MYC.

### **3.4 Dokazivanje vezanja proteina p63/p73 s proteinom ITCH**

Za dokazivanje interakcija između proteina p63 i p73 s proteinom ITCH koristila sam metodu koimunoprecipitacije u prolazno transfeciranim stanicama karcinoma pluća koje ne ekspimiraju protein p53, H1299 i stanicama rabdomiosarkoma koje ekspimiraju mutirani p53, RD. Nakon transfekcije, ukupni izolirani stanični lizat sam imunoprecipitala agaroznim zrcima konjugiranim antitijelom anti-c-MYC. Na zrnca se veže protein ITCH s c-MYC privjeskom zajedno sa svim proteinima s kojima stvara interakcije. Analizom metodom *Western blot* su zatim dokazane interakcije s proteinima od interesa, p63 i p73. Stanice su prolazno transfecirane plazmidima koji nose gen za protein ITCH (divlji tip proteina ITCH<sup>wt</sup> ili protein s mutacijom u katalitičkoj domeni, C830A, ITCH<sup>mut</sup>) i kotransfecirane izoformama proteina p63 (TAp63 $\alpha$  ili  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ) ili p73 (TAp73 $\beta$  ili  $\Delta$ Np73 $\alpha$ ) u omjeru 1:1. Proteinski lizati stanica (WB) korišteni su kao provjera transfekcije i metode *Western blot*, a supernatanti (SNT) kao provjera uspješnosti koimunoprecipitacije.

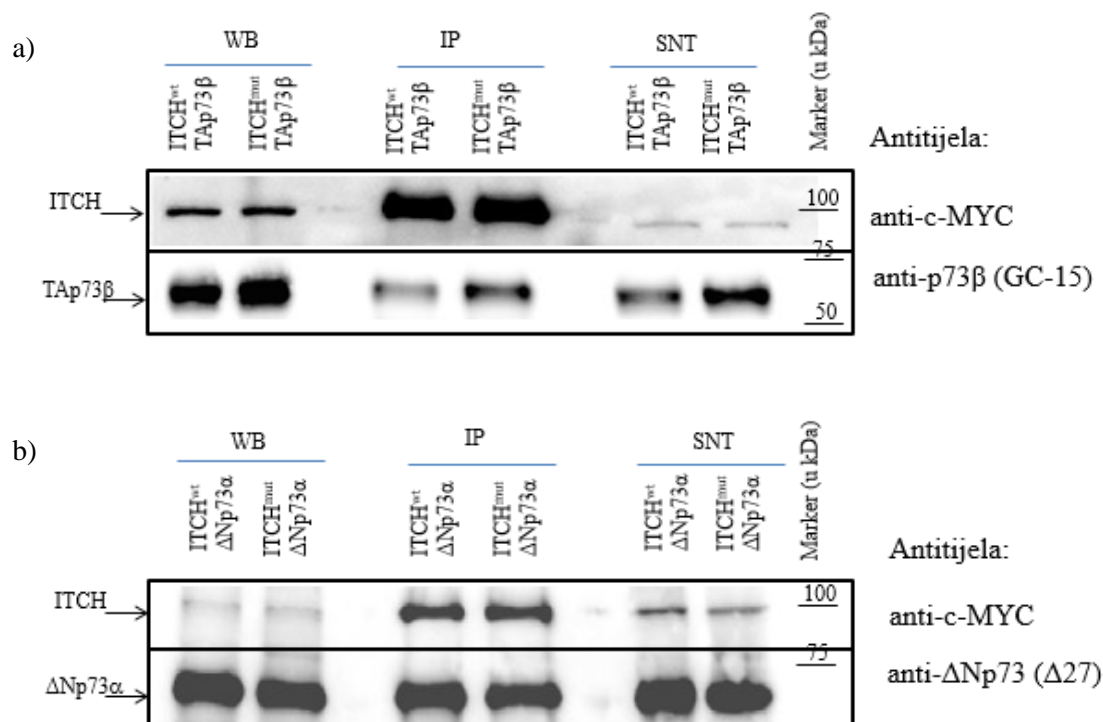
#### **3.4.1 Dokazivanje vezanja proteina p63/p73 s proteinom ITCH u stanicama koje ne ekspimiraju protein p53**

Pokazala sam da dolazi do stvaranja kompleksa između egzogenih izoformi TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$  i fuzijskog proteina ITCH-c-MYC u stanicama karcinoma pluća, H1299 koje ne ekspimiraju protein p53 (Slika 14). Stanice su prolazno kotransfecirane plazmidima koji nose cDNA za protein ITCH (ITCH<sup>wt</sup> ili ITCH<sup>mut</sup>) i za p63 (TAp63 $\alpha$  ili  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ). Nakon koimunoprecipitacije agaroznom zrcima na koje je vezano antitijelo anti-c-MYC, pokazana je analizom *Western blot* uspješnost vezanja proteina ITCH-c-MYC primarnim antitijelom anti-c-MYC, a izoforme p63 primarnim antitijelom H-129. Iz slika 14a i 14b vidljivo je kako je stvaranje kompleksa izraženije između proteina ITCH i izoforme koja ne sadrži transaktivacijsku domenu,  $\Delta$ Np63 $\alpha$  u odnosu na izoformu TAp63 $\alpha$ .



**Slika 14. Interakcije proteina p63 s proteinom ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup> u stanicama H1299 koje ne eksprimiraju protein p53.** Imunoprecipitacija ITCH s anti-c-MYC agaroznim zrcima. Slika a) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme proteina TAp63α i proteina ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>, dok slika b) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme ΔNp63α i ITCH<sup>wt</sup>, odnosno ITCH<sup>mut</sup>. (WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije)

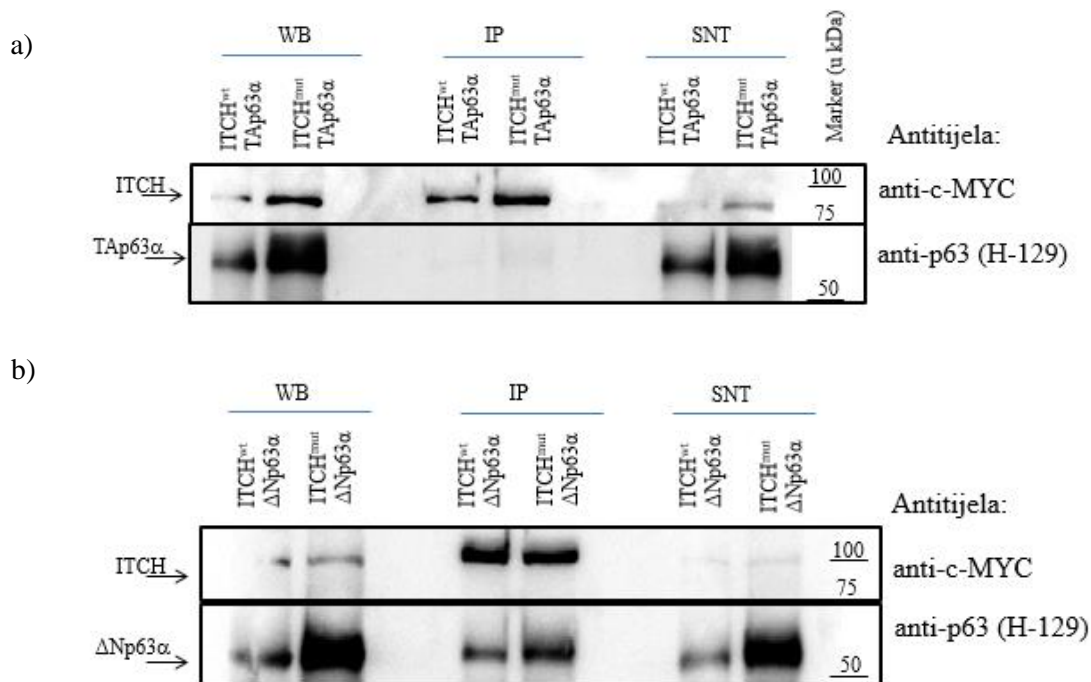
Na isti način u tim je stanicama pokazano da egzogeni protein ITCH-c-MYC stvara interakcije s egzogenim proteinom p73. Stanice su prolazno kotransfecirane plazmidima sa cDNA za protein ITCH (ITCH<sup>wt</sup> ili ITCH<sup>mut</sup>) i plazmidima s izoformama TAp73β ili ΔNp73α. Interakcije su dokazivane koimunoprecipitacijom s anti-c-MYC agaroznim zrcima i analizirane metodom *Western blot* korištenjem antitijela GC-15 (za TAp73β) i Δ27 (za ΔNp73α). Kao i kod proteina p63, izoforme kojima nedostaje transaktivacijska domena pokazuju veći afinitet za stvaranje kompleksa s proteinom ITCH u odnosu na izoformu TAp73β (Slika 15).



**Slika 15. Interakcija proteina p73 s proteinom ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup> u stanicama H1299 koje ne eksprimiraju protein p53.** Imunoprecipitacija ITCH s anti-c-MYC agaroznim zrcima. Slika a) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme proteina TAp73β i proteina ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>, dok slika b) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme ΔNp73α i ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>. WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije.

### 3.4.2 Dokazivanje vezanja proteina p63/p73 i proteina ITCH u stanicama s mutiranim p53

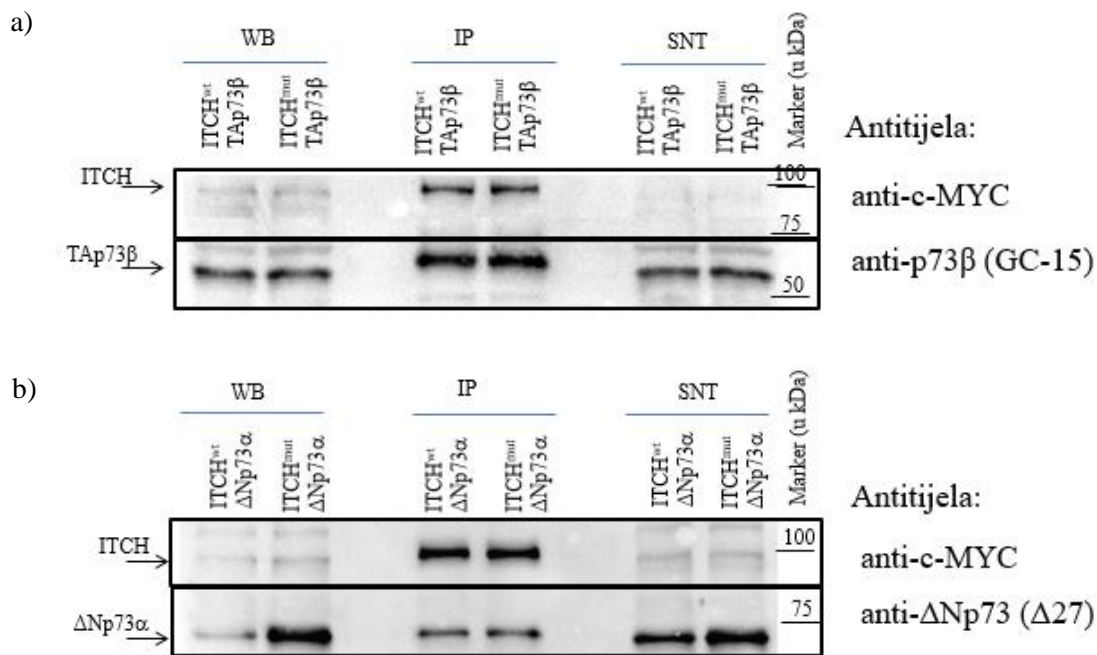
Istim postupkom dokazivala sam interakcije između proteina ITCH (ITCH<sup>wt</sup>/ITCH<sup>mut</sup>) i proteina p63 (TAp63α ili ΔNp63α) ili p73 (TAp73β ili ΔNp73α) u stanicama rabdiosarkoma, RD koje eksprimiraju endogeni mutirani protein p53. Nakon koimunoprecipitacije s c-MYC agaroznim zrcima, protein ITCH je dokazivan primarnim antitijelom anti-c-MYC, dok je protein p63 dokazivan primarnim antitijelom H-129. Dokazala sam da dolazi do stvaranja interakcija između proteina ITCH i izoforme ΔNp63α, dok su interakcije između ITCH i TAp63α vrlo slabe (Slika 16). Također, uvođenje mutacije u gen za ITCH neznatno utječe na afinitet vezivanja na protein p63.



**Slika 16. Interakcije proteina p73 s proteinom ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup> u stanicama RD koje eksprimiraju mutirani protein p53.** Imunoprecipitacija ITCH s anti-c-MYC agaroznim zrcima. Slika a) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme proteina TAp63 $\alpha$  i proteina ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>, slika b) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme  $\Delta$ Np63 $\alpha$  i ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>. (WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije)

U stanicama koje endogeno eksprimiraju mutirani protein p53, koimunoprecipitacijom anti-c-MYC agaroznim zrcima i analizom *Western blot* potvrđeno je kako egzogeni protein ITCH stvara interakcije s egzogenim proteinom p73. Korištenjem antitijela anti-c-MYC za protein ITCH, GC-15 za izoformu TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ 27 za izoformu  $\Delta$ Np73 $\alpha$  pokazano je da protein ITCH ima veći afinitet za stvaranje interakcija s izoformom TAp73 $\beta$  nego s izoformom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (Slika 17). Također, uvođenje mutacije u gen za ITCH ne utječe na afinitet vezivanja na protein p73.





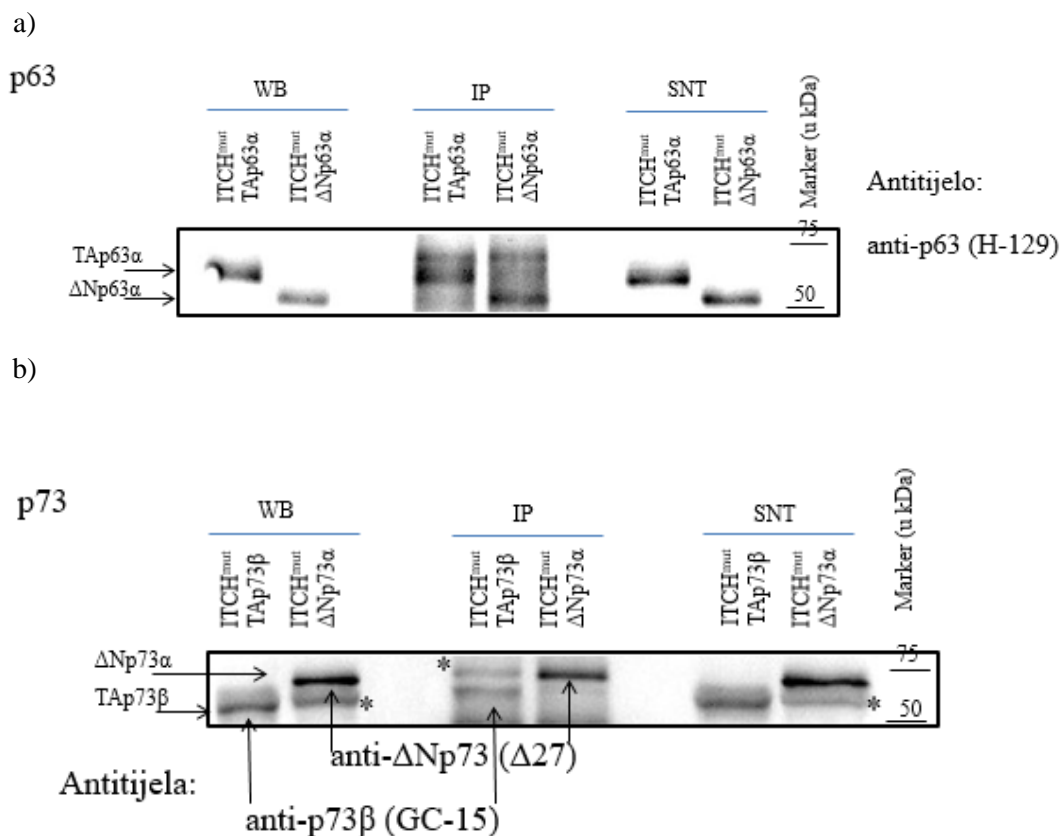
**Slika 17. Interakcije proteina p73 s proteinom ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup> u stanicama RD koje eksprimiraju mutirani protein p53.** Imunoprecipitacija ITCH s anti-c-MYC agaroznim zrcima. Slika a) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme proteina TAp73β i proteina ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>, dok slika b) prikazuje razlike u jačini interakcija između izoforme ΔNp73α i ITCH<sup>wt</sup> i ITCH<sup>mut</sup>. (WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije)

U svim provedenim analizama nije pokazana značajna razlika u afinitetu za stvaranje interakcija između divljeg tipa i neaktivnog mutiranog oblika proteina ITCH s proteinima p63 i p73.

### 3.5 Dokazivanje vezanja endogenog mutiranog p53 i egzogenih p63/p73

Kako bih dokazala interakcije između endogenog mutiranog proteina p53 i egzogenih proteina p63 i p73 u prisutnosti mutiranog proteina ITCH, stanice rabdiosarkoma, RD transfecirala sam plazmidima koji sadrže gene za fuzijski protein ITCH<sup>mut</sup>-c-MYC i proteine p63 (TAp63α ili ΔNp63α) ili p73 (TAp73β ili ΔNp73α) u omjeru 1:1. Izolirani stanični lizat koimunoprecipitiran je korištenjem magnetskih zrnca i antitijela za p53 (DO-1) te je provedena analiza metodom *Western blot* s antitijelima za proteine p63 (H-129), izoformu TAp73β (GC-15) i izoformu ΔNp73α (Δ27). Dokazala sam da dolazi do stvaranja heterokompleksa između endogenog mutiranog proteina p53 i egzogenih proteina p63 i p73 kada je u stanicama prisutan egzogeni mutirani protein ITCH (Slika 18). Također, stvaranje heterokompleksa je izrazitije kod izoformi proteina p63 i p73 koje sadrže transaktivacijsku domenu TAp63α/ TAp73β.





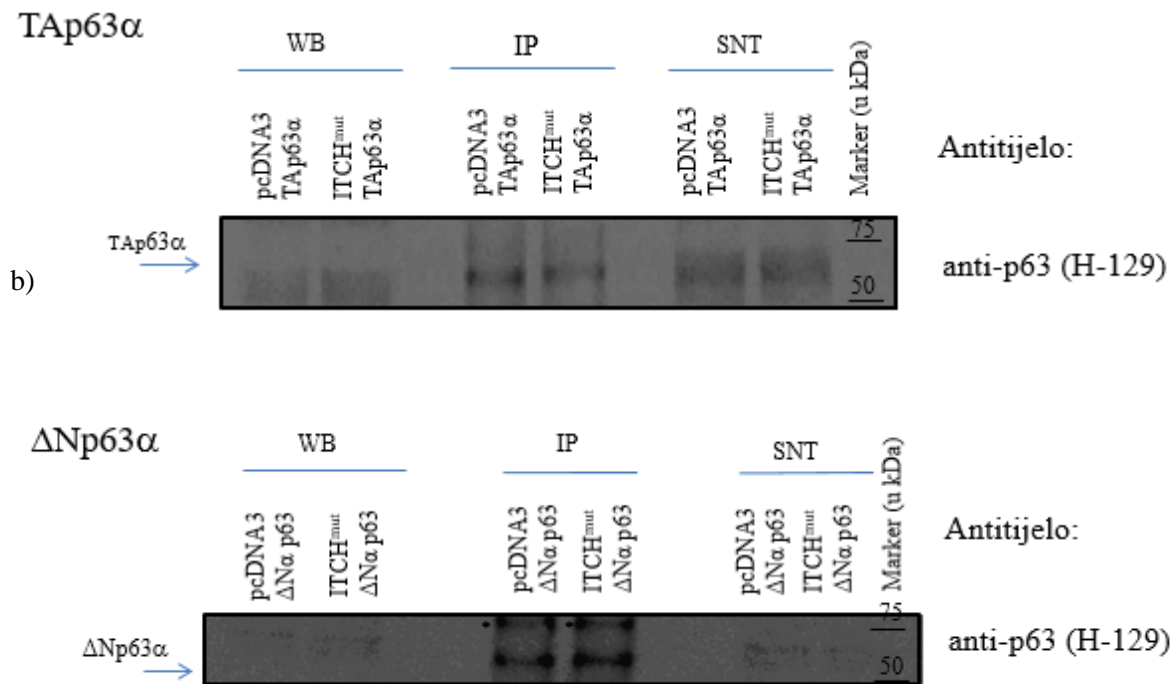
**Slika 18. Dokazivanje heterokompleksa između endogenog mutiranog proteina p53 i egzogenih proteina p63 i p73 u stanicama RD (stanice s mutiranim p53).** Imunoprecipitacija p53 pomoću antitijela DO-1. Slika a) prikazuje komplekse mutiranog endogenog proteina p53 i egzogenih izoformi TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Slika b) prikazuje komplekse mutiranog endogenog proteina p53 i egzogenih izoformi TAp73 $\beta$  ili  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije, \* - nespecifične vrpce)

### 3.6 Utjecaj proteina ITCH na vezanje mutiranog p53 i p63/p73

Istražila sam postoje li razlike u stvaranju heterokompleksa između endogenog mutiranog proteina p53 i egzogenih proteina p63 i p73 u stanicama rabdomiosarkoma, uz prisutnost proteina ITCH ili bez njega. Stanice sam transfecirala plazmidnim vektorom (pcDNA3) odnosno plazmidom koji sadrži cDNA za ITCH-c-MYC i to mutirani oblik (ITCH<sup>mut</sup>) u kombinaciji s izoformama proteina p63 i p73.

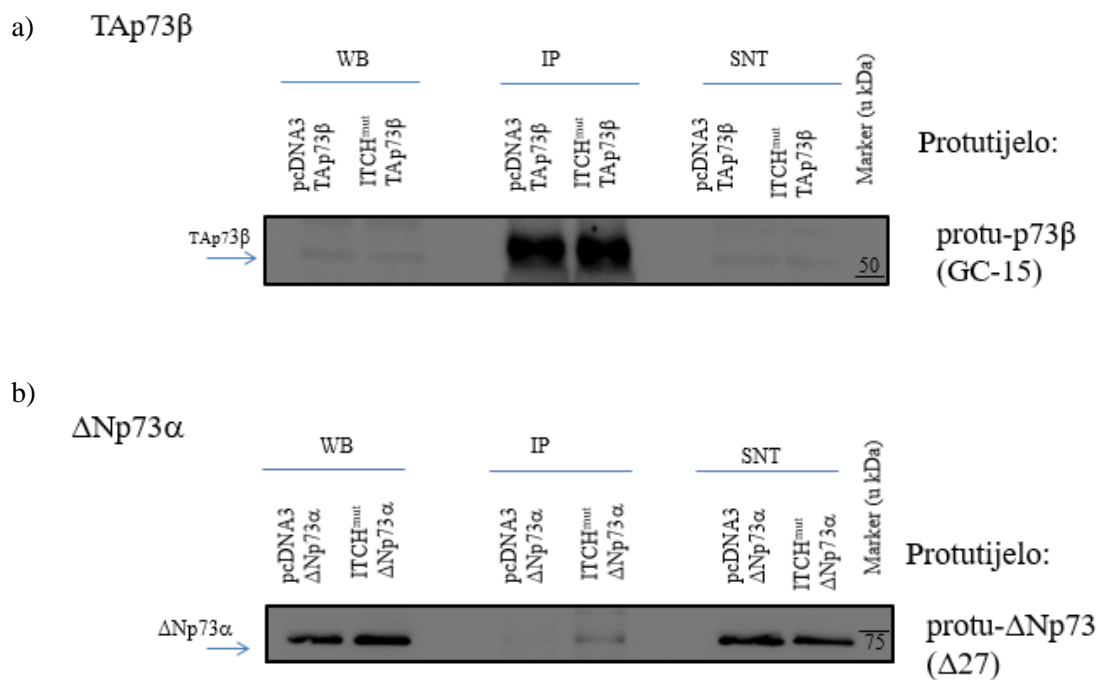
Endogeni mutirani protein p53 imunoprecipitirala sam koristeći antitijelo anti-p53 (DO-1), a izoforme proteina p63 su potom detektirane antitijelom anti-p63 (H-129). Utvrdila sam da protein ITCH<sup>mut</sup> ne utječe na intenzitet interakcije između mutiranog proteina p53 i izoformi p63 -  $\Delta$ Np63 $\alpha$  i TAp63 $\alpha$  (Slika 19).

a)



**Slika 19. Utjecaj proteina ITCH na intenzitet interakcije između mutiranog proteina p53 i izoformi TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$ .** Koimunoprecipitacija mutiranog p53 s DO-1 u stanicama RD (mutiran p53) transfeciranim s TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$  u kombinaciji s ITCH<sup>mut</sup> ili vektorskim plazmidom bez inserta (pcDNA). Intenzitet vrpce koji odgovara jačini vezanja je veći kod izoforme  $\Delta$ Np63 $\alpha$  bez ITCH<sup>mut</sup> a kod izoforme TAp63 $\alpha$  dodatak ITCH<sup>mut</sup> nema utjecaja. Slika a) prikazuje stvaranje kompleksa između mutiranog p53 i izoforme TAp63 $\alpha$ , dok slika b) prikazuje stvaranje kompleksa između mutiranog p53 i izoforme  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . (WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije, \*- nespecifične vrpce)

Postupak je ponovljen i s izoformama proteina p73. Endogeni mutirani protein p53 imunoprecipitirala sam antitijelom DO-1, a izoforme proteina p73 su detektirane antitijelima GC-15 (TAp73 $\beta$ ) i  $\Delta$ 27 ( $\Delta$ Np73 $\alpha$ ). U ovom slučaju sam dokazala da protein ITCH nije značajno utjecao na jačinu interakcije između mutiranog proteina p53 i proteina TAp73 $\beta$ , ali je intenzitet interakcije između mutiranog p53 i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  bio jači u prisutnosti proteina ITCH<sup>mut</sup> (Slika 20).



**Slika 20. Utjecaj proteina ITCH na intenzitet interakcije između mutiranog proteina p53 i izoformi TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ .** Koimunoprecipitacija mutiranog p53 s DO-1 u stanicama RD (mutiran p53) transfeciranim s TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u kombinaciji s ITCH<sup>mut</sup> ili vektorskim plazmidom. Slika a) prikazuje stvaranje kompleksa između mutiranog p53 i izoforme TAp73 $\beta$ , dok slika b) prikazuje stvaranje kompleksa između mutiranog p53 i izoforme  $\Delta$ Np73 $\alpha$ . Intenzitet vrpce koji odgovara jačini vezanja je veći kod izoforme  $\Delta$ Np73 $\alpha$  s dodatkom ITCH<sup>mut</sup> a kod izoforme TAp73 $\beta$  dodatak ITCH<sup>mut</sup> nema utjecaja na jačinu vezanja. (WB - ukupni stanični lizat, IP - koimunoprecipitirani proteini, SNT - supernatant zaostao nakon koimunoprecipitacije)

## 4 RASPRAVA

Otkada je protein p53 izoliran 1979. godine (Lane i Crawford, 1979; Linzer i Levine, 1979) i prepoznat kao prvi tumor-supresorski protein (Eliyahu i sur., 1989), započinjaju njegova intenzivna istraživanja. p53 ima kritičnu ulogu u kontroli staničnog rasta i održavanju genomske stabilnosti. Osim proteina p53, u istu porodicu proteina svrstani su i proteini p63 i p73 s kojima dijeli visok stupanj homologije i neke zajedničke funkcije, ali zasebno imaju neke nove, specifične funkcije. Svi geni porodice proteina p53 imaju dva promotora i različito se prekrajaju na C-krajevima što omogućuje sintezu tkivno specifičnih izoformi s različitim funkcijama. Za razliku od gena *TP63* i *TP73*, koji rijetko imaju mutacije, gen *TP53* najčešće je mutiran gen u tumorima ljudi i povezuje se s lošijim prognozama i ishodima bolesti. Najčešće su mutacije u domeni koja veže DNA gdje dolazi do točkastih mutacija koje imaju za posljedicu promjenu aminokiseline što dovodi do inaktivacije tumor-supresorske funkcije (Kato i sur., 2003). p53 stvara tetramere koji se vežu za određeni slijed na DNA i aktiviraju transkripciju. Nađeno je da u stanicama dolazi do stvaranja homotetramera, ali i heterotetramera između članova porodice proteina p53 (Zaika i sur., 2002; Moll i Slade, 2004). Divlji tip proteina p53 ne veže se efikasno s proteinima TAp63 i TAp73 (Gebel i sur., 2016), ali mutacije u domeni koja veže DNA omogućuju veći afinitet mutiranog proteina p53 za stvaranje interakcija s proteinima p63 i p73 zbog promjene konformacije domene koja veže DNA (Wong i sur., 1999). Na taj način mutirani protein onemogućava normalnu funkciju proteina p63 i p73 te se oni ne mogu vezati na DNA i potaknuti transkripciju (Brosh i Rotter, 2009).

### 4.1 Interakcije između proteina ITCH i p63/p73

Članovi porodice p53 su transkripcijski faktori te je potrebna njihova precizna vremenska i prostorna regulacija. Ona se postiže posttranslacijskim modifikacijama, od kojih ubikvitinacija omogućava njihovo brzo uklanjanje iz jezgre i razgradnju. Protein p53 je reguliran ubikvitinskom ligazom MDM2 koja na njega veže ubikvitin i usmjerava ga za razgradnju putem proteasoma. Istraživanjima je pokazano da ubikvitinska ligaza MDM2 veže i proteine TAp73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  te slabije proteine TAp63 $\alpha$  i  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , što je povezano sa stupnjem njihove razgradnje, te pokazuje da MDM2 nije glavni regulator razine proteina p63 i p73 u stanicama (Zdzalik i sur., 2010; Stindt i sur., 2014).

Za razgradnju p63 i p73 odgovorna je ubikvitinska ligaza ITCH koja veže i ubikvitinira TAp73 i  $\Delta$ Np73, TAp63 i  $\Delta$ Np63, ali ne p53 (Rossi i sur., 2005, 2006). Nađeno je da se ITCH

brzo razgrađuje kao odgovor na stanični stres, omogućujući tako da razina p73 naraste, uključujući obje izoforme, TAp73 i  $\Delta$ Np73 (Rossi i sur., 2005). Međutim, kao odgovor na oštećenje DNA,  $\Delta$ Np73 se brzo razgradi, za razliku od TAp73 (Maisse i sur., 2004). Ipak, ITCH je odgovoran za održavanje niskih razina i TAp73 i  $\Delta$ Np73 u normalnim uvjetima (Rossi, 2005), a kada dođe do oštećenja DNA, smanjenje razine proteina ITCH omogućuje stabilizaciju obje izoforme. Dakle, drugi put je odgovoran za degradaciju  $\Delta$ Np73 a uključuje ubikvitinsku ligazu PIR2 koja se aktivira povišenom razinom izoforme TAp73 kada dođe do stresnih uvjeta u stanici.

U ovom diplomskom radu provjerila sam dolazi li do interakcija između proteina ITCH divljeg tipa, odnosno mutiranog ITCH<sup>mut</sup> (C830A) i proteina p63 i p73 u stanicama H1299 koje ne eksprimiraju protein p53 te stanicama RD koje eksprimiraju mutirani protein p53<sup>mut</sup> (R248W). U obje stanične linije potvrdila sam interakcije između egzogene ubikvitinske ligaze ITCH (i divljeg tipa i mutiranog neaktivnog oblika) i egzogenih izoformi TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  čime sam potvrdila prijašnje otkriće Rossija i suradnika (Rossi i sur., 2005, 2006).

## 4.2 Interakcije između proteina p53<sup>mut</sup> i p63/p73

Nadalje, ispitivala sam interakcije mutiranog proteina p53 s egzogenim proteinima p63 i p73. Iz literature je poznato da između mutiranih p53 i p63/p73 dolazi do stvaranja interakcija a interakcija ovisi o prirodi mutacije p53. Kroz interakcije mutirani p53 inhibira tumorsupresorsku aktivnost proteina p63/p73, te kažemo da ima dominantno negativni utjecaj na njihovu aktivnost (DiComo i sur., 1999; Gaiddon i sur., 2001; Strano i sur., 2000, 2002). U ovom radu potvrdila sam da u stanicama RD između endogenog p53<sup>mut</sup> koji ima mutaciju na kodonu 248 (p53<sup>R248W</sup>) i transfeciranih izoformi proteina p63 i p73 dolazi do stvaranja heterokompleksa. Do sada je poznato da p53<sup>R248W</sup> ostvaruje interakciju s p73 (Gaiddon i sur., 2001) i s p63 (Strano i sur., 2002). Međutim, dosadašnja istraživanja nisu precizno odredila interakcije sa specifičnim izoformama p63/p73. Pronašla sam da sve ispitivane izoforme, TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  stvaraju interakcije s p53<sup>R248W</sup>.

Međutim, željela sam ustanoviti utječe li protein ITCH, i to njegov mutirani oblik, za koji sam našla da uspješno veže proteine p63 i p73, na jačinu interakcije između p53<sup>R248W</sup> i TAp63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  odnosno  $\Delta$ Np73 $\alpha$  te može li tako utjecati na negativno dominantni utjecaj mutiranog p53. Pokazala sam da je utjecaj egzogenog mutiranog proteina ITCH na stvaranje interakcija između p53<sup>R248W</sup> i egzogenih izoformi proteina p63 gotovo zanemariv, odnosno da

je jačina interakcija između mutiranog proteina p53 i egzogenih proteina p63 jednaka kada nije prisutan egzogeni protein ITCH i kada je prisutan njegov mutirani oblik. Isto sam našla i za TAp73β. Međutim, intenzitet interakcije između p53<sup>R248W</sup> i ΔNp73α bio jači u prisutnosti proteina ITCH<sup>mut</sup>. Stoga zaključujem da ITCH nema utjecaja na inhibicijsku aktivnost mutp53<sup>R248W</sup> u interakciji s proteinima p63 i p73. Poznato je da domene na C-kraju proteina p63 i p73 stvaraju interakcije s transaktivacijskim područjima izoformi TAp63/TAp73 te na taj način fizički ometaju stvaranje interakcija s drugim proteinima, poput p53 ili proteina ITCH (Rossi i sur., 2006). To podupiru i rezultati koji pokazuju da izoforme ΔN kojima nedostaje transaktivacijska domena imaju jači afinitet za stvaranje interakcija i s mutiranim proteinom p53 i s ubikvitinskom ligazom ITCH (osim u slučaju TAp73β).

Ometanje stvaranja interakcija p53<sup>mut</sup> s p63/p73 moglo bi omogućiti reaktivaciju tumorsupersorskih uloga p63 i p73. Tako su Stindt i suradnici našli da MDM2 može utjecati na aktivnost mutiranog proteina p53 tako da uklanja inhibiciju aktivnosti p63 pomoću mutiranog p53. Međutim, pronađeno je da MDM2 može pojačati inhibiciju p73 pomoću mutiranog p53 (Stindt i sur., 2014). Nadalje, *heat-shock protein 70* (HSP70) može imati ulogu u stabilizaciji interakcije p53<sup>R175H</sup>/TAp73α a destabilizirati p53<sup>R175H</sup>/TAp63α (Weich i sur., 2012). Osim HSP70 i MDM2, i drugi proteini mogu utjecati na interakcije, uključujući HSP90, kompleks CCT (od engl. *chaperonin containing tailless complex polypeptide 1*), HAUSP (od engl. *herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*) ili CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*). Inhibicija interakcije p53<sup>mut</sup>/p63/p73 predstavlja jedan od terapijskih pristupa uliječenju tumora u kojima je p53 mutiran. Dodatnu složenost predstavlja postojanje brojnih izoformi svih članova porodice p53 (Slade i sur., 2010).

Iako je ubikvitinska ligaza ITCH glavni regulator razine proteina p63 i p73 u stanicama, izgleda da ima zanemarivo djelovanje na interakcije između mutiranog proteina p53 i proteina p63/p73.

## 5 ZAKLJUČAK

1. Dokazano je vezanje proteina p63/p73 s proteinom ITCH u stanicama H1299 (kod kojih ne dolazi do ekspresije p53). Izoforme kojima nedostaje transaktivacijsko područje ( $\Delta Np63\alpha$  i  $\Delta Np73\alpha$ ) snažnije vežu nego TAp63 $\alpha$  i TAp73 $\beta$ . ITCH i ITCH<sup>mut</sup> vežu se s jednakim afinitetom za TAp63 $\alpha$  i  $\Delta Np73\alpha$ , a za  $\Delta Np63\alpha$  i TAp73 $\beta$  snažnije se veže ITCH<sup>mut</sup>.
2. Dokazano je vezanje proteina p63/p73 s proteinom ITCH u stanicama RD (eksprimiraju mutirani p53). Dolazi do stvaranja interakcija između ITCH i izoforme  $\Delta Np63\alpha$ , dok su interakcije između proteina ITCH i TAp63 $\alpha$  vrlo slabe, te da ITCH ima veći afinitet za stvaranje interakcija s izoformom TAp73 $\beta$  nego s izoformom  $\Delta Np73\alpha$ . ITCH i ITCH<sup>mut</sup> vežu se s jednakim afinitetom.
3. Dokazano je vezanje endogenog mutiranog p53 i p63/p73 u stanicama RD u prisutnosti ITCH<sup>mut</sup>. Dolazi do stvaranja heterokompleksa između endogenog mutiranog proteina p53 i egzogenih proteina p63 i p73 kada je u stanicama prisutan egzogeni mutirani protein ITCH<sup>mut</sup>.
4. Utvrđeno je da protein ITCH<sup>mut</sup> ne utječe na intenzitet interakcije između mutiranog proteina p53<sup>mut</sup> i izoformi p63 -  $\Delta Np63\alpha$  i TAp63 $\alpha$  te nije značajno utjecao na jačinu interakcije između mutiranog proteina p53 i proteina TAp73 $\beta$ , ali je intenzitet interakcije između mutiranog p53<sup>mut</sup> i  $\Delta Np73\alpha$  bio jači u prisutnosti proteina ITCH<sup>mut</sup>.

## 6 LITERATURA

Agami, R., Blandino, G., Oren, M., Shaul, Y. Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399, 809–13 (1999)

Allocati, N., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. P63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Experimental Cell Research* 318, 1285–1290 (2012)

Ardley, H.C., Robinson, P.A. E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.* 41, 15 (2005)

Bálint, E., Bates, S., Vousden, K.H. Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene* 18, 3923–3929 (1999)

Bénard, J., Douc-Rasy, S., Ahomadegbe, J.C. TP53 family members and human cancers. *Human Mutation* 21, 182–191 (2003)

Blandino, G., Dobbstein, M. p73 and p63: Why do we still need them? *Cell Cycle* 3, 886–894 (2004)

Bourdon, J.-C. Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D., Lane P., David P.F. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122–37 (2005)

Brosh, R., Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–13 (2009)

Calabro, V., Mansueto, G., Parisi, T., Vivo, M., Calogero, R., Mantia, G. The human MDM2 oncoprotein increases the transcriptional activity and the protein level of the p53 homolog p63. *J. Biol. Chem.* 277, 2674–2681 (2002)

Cancino, G.I., Fatt, M.P., Miller, F.D., Kaplan, D.R. Conditional ablation of p63 indicates that it is essential for embryonic development of the central nervous system. *Cell Cycle* 14, 3270–81 (2015)

Celli, J., Duijf, P., Hamel, B., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R., Van Buggenhout, G. Heterozygous Germline Mutations in the p53 Homolog p63 Are the Cause of EEC Syndrome. *Cell* 99, 143–153 (1999)

Chi, S.W., Ayed, A., Arrowsmith, C.H. Solution structure of a conserved C terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J.* 18, 4438–4445 (1999)

Concin, N., Becker, K., Slade, N., Erster, S., Mueller-Holzner, E., Ulmer, H., Daxenbichler, G., Zeimet, A., Zeillinger, R., Marth, C. Transdominant  $\Delta$ TAp73 Isoforms Are



Frequently Up-regulated in Ovarian Cancer. Evidence for Their Role as Epigenetic p53 Inhibitors in Vivo. *Cancer Res.* 64, 2449–2460 (2004)

Courtois, S., Fromentel, C.C., de Hainaut, P. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene* 23, 631–638 (2004)

Davison, T. S., Vagner, C., Kaghad, M., Caput, D., Arrowsmith, C.H. p73 and p63 Are Homotetramers Capable of Weak Heterotypic Interactions with Each Other but Not with p53. *J. Biol. Chem.* 274, 18709–14 (1999)

De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M., Melino, G. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J. Exp. Med.* 188, 1763–8 (1998)

Deyoung, M.P., Ellisen, L.W. P63 and P73 in Human Cancer: Defining the Network. *Oncogene* 26, 5169–5183 (2007)

Di Como, C.J., Gaidon, C., Prives, C. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 19, 1438–1449 (1999)

Donehower, L., Harvey, M., Slagle, B., McArthur, M., Montgomery, C., Butel, J., Bradley. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215–221 (1992)

Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., Oren, M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8763–7 (1989)

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., Oren, M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646–649 (1984)

Ferriauolo, M., Di Agostino, S., Blandino G., Strano, S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front. Oncol* 6:77 (2016)

Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D. p63 and p73 are required for p53- dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416, 560–565 (2002)

Gaidon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., Prives, C. A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain. *Mol. And Cell Biol.* 21, 1874–87 (2001)

Gebel, J., Luh, L., Coutandin, D., Osterburg, C., Löhr, F., Schäfer, B., Frombach, A., Sumyk, M., Buchner, L., Krojer, T., Salah, E. Mechanism of TAp73 inhibition by  $\Delta$ Np63 and structural basis of p63/p73 hetero-tetramerization. *Cell Death Differ.* 1930-1940 (2016)

Ghioni, P., D'Alessandra, Y., Mansueto, G., Jaffray, E., Hay, R., La Mantia, G., Guerrini, L. The protein stability and transcriptional activity of p63alpha are regulated by SUMO-1 conjugation. *Cell Cycle* 4, 183–190 (2005)

Gonzalez, S., Prives, C., Cordon-Cardo, C. P73Alpha Regulation by Chk1 in Response to DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8161–8171 (2003)

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrera, P., McKeon, F., Caput, D. Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell* 90, 809–819 (1997)

Kato, S., Han, S., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., Ishioka, C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8424–8429 (2003)

Kay, B. K., Williamson, M.P., Sudol, M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal*, 14(2), 231-41 (2000)

Keyes, W., Pecoraro, M., Aranda, V., Vernersson-Lindahl, E., Li, W., Vogel, H., Guo, X., Garcia, E., Michurina, T., Enikolopov, G.  $\Delta$ n63 $\alpha$  is an oncogene that targets chromatin remodeler Lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 8, 164–176 (2011)

Kovalev, S., Marchenko, N., Swendeman, S., Laquaglia, M., Moll, U.M. Expression Level, Allelic Origin, and Mutation Analysis of the p73 Gene in Neuroblastoma Tumors and Cell Lines<sup>1</sup>. *Cell Growth Differ.* 9, 897–903 (1998)

Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16 (1992)

Lane, D.P., Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263 (1979)

Levero M., De Laurenzi V., Costanzo A., Sabatini, A., Gong, J., Wang J.W.J. Melino, G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* 1661–70 (2000)

- Liefer, K., Koster, M., Wang, X., Yang, A., McKeon, F., Roop, D. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60, 4016–4020 (2000)
- Linzer, D.I.H., Levine, A.J. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52 (1979)
- Little, N.A., Jochemsen, A.G. P63. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 6–9 (2002)
- Lokshin, M., Li, Y., Gaididon, C., Prives, C. p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* 35, 340–352 (2007)
- Maisse, C., Munarriz, E., Barcaroli, D., Melino, G., De Laurenzi, V. DNA damage induces the rapid and selective degradation of the  $\Delta$ Np73 isoform, allowing apoptosis to occur. *Cell Death Differ.* 11, 685–687 (2004)
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G., Del Sal, G. Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol. Cell* 14, 625–636 (2004)
- Marin, M., Jost, C., Brooks, L., Irwin, M., O’Nions, J., Tidy, J., James, N., McGregor, J., Harwood, C., Yulug, I., Vousden, K., Allday, M. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat. Genet.* 25, 47–54 (2000)
- Massalay, N., Frances, B., Mouledous, L. Roles of the ubiquitin proteasome system in the effects of drugs of abuse. *Front. Mol. Neurosci.* 7:99 (2014)
- Medawar, A., Virolle, T., Rostagno, P., de la Forest-Divonne, S., Gambaro, K., Rouleau, M., Aberdam, D.  $\Delta$ Np63 is essential for epidermal commitment of embryonic stem cells. *PLoS One* 3 (10): e3441, (2008)
- Melino, G., Gallagher, E., Aqeilan, R., Knight, R., Peschiaroli, A., Rossi, M., Scialpi, F., Malatesta, M., Zocchi, L., Browne, G. Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer. *Cell Death Differ.* 15, 1103–1112 (2008)
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T., Knight, R.A. Functional regulation of p73 and p63: Development and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 663–670 (2003)
- Mills, A., Zheng, B., Wang, X., Vogel, H., Roop, D., Bradley, A. P63 Is a P53 Homologue Required for Limb and Epidermal Morphogenesis. *Nature* 398, 708–713 (1999)

Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., Caput, D. Covalent modification of p73 $\alpha$  by SUMO-1: Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J. Biol. Chem.* 275, 36316–36323 (2000)

Moll, U.M. i Slade, N. p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation. National Cancer Institute. *Mol. Cancer Res.* 2(7):371-86 (2004)

Murray-Zmijewski, F., Lane, D., Bourdon, J.-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 13(6):962-72 (2006).

Oberst, A., Rossi, M., Salomoni, P., Pandolfi, P., Oren, M., Melino, G., Bernassola, F. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 707–712 (2005)

Ongkeko, W., Wang, X., Siu, W., Lau, A., Yamashita, K., Harris, A., Cox, L., Poon, R. MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Curr. Biol.* 9, 829–832 (1999)

Parsa, R., Yang, A., McKeon, F., Green, H. Association of p63 with Proliferative Potential in Normal and Neoplastic Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 113, 1099–1105 (1999)

Pecorino, L., Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics. OUP Oxford, 3rd edition (2008)

Pozniak, C., Radinovic, S., Yang, A., Mckeon, F., Kaplan, D., Miller, F. An Anti-Apoptotic Role for the p53 Family Member, p73, During Developmental Neuron Death. *Science* 289, 304-306 (2000)

Rossi, M., Aqeilan, R., Neale, M., Candi, E., Salomoni, P., Knight, R., Croce, C., Melino, G. The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12753–12758 (2006)

Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D., Liu, Y., Vousden, K., Cesareni, G., Melino, G. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J.* 24, 836–48 (2005)

Rossi, M., De Simone, M., Pollice, A., Santoro, R., La Mantia, G., Guerrini, L., Calabro, V. Itch/AIP4 associates with and promotes p63 protein degradation. *Cell Cycle* 5, 1816–1822 (2006)

Schultz, J., Ponting, C. P., Hofmann, K., Bork, P. SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.* 6, 249–53 (1997)

Scoumanne, A., Harms, K.L. Chen, X. Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1178–1185 (2005)

Serber, Z., Lai, H., Yang, A., Ou, H., Sigal, M., Kelly, A., Darimont, B., Duijf, P., van Bokhoven, H., McKeon, F., Dotsch, V. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8601–8611 (2002)

Slade N., Zaika A.I., Erster S., Moll U.M. DeltaNp73 stabilizes TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. *Cell Death Differ.* 11, 357-360 (2004)

Slade N., Zorić A., Horvat A. The p53/p63/p73 family of proteins – the focus on isoforms and mutants in cancer. *Period Biol* 112, 425–432 (2010)

Slade N., Horvat A. Targeting p73 - A Potential Approach in Cancer Treatment. *Curr Pharm Des* 17: 591-602 (2011)

Stindt, M.H., Muller, P.A.J., Ludwig, R.L., Kehrlöesser, S., Dotsch, V. And Voundsen, K.H. Functional interplay between MDM2, p63/p73 and mutant p53. *Oncogene* 34(33), 4300-10 (2015)

Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A. Physical interaction with human tumor derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem* 277, 18817–18826 (2002)

Strano, S., Rossi, M., Fontemaggi, G., Munarriz, E., Soddu, S., Sacchi, A., Blandino, G. From p63 to p53 across p73. *FEBS Letters* (2001).

Strano, S., Rossi, M., Fontemaggi, G., Munarriz, E., Soddu, S., Sacchi, A., Blandino, G. Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *J. Biol. Chem.* 275, 29503–12 (2000)

Su, X., Paris, M., Gi, Y., Tsai, K., Cho, M., Lin, Y., Biernaskie, J., Sinha, S., Prives, C., Pevny, L., Miller, F., Flores, E. TAp63 Prevents Premature Aging by Promoting Adult Stem Cell Maintenance. *Cell Stem Cell* 5, 64–75 (2009)

Sudol, M. Structure and function of the WW domain. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 65, 113–132 (1996)

Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Rufini, A., Cheung, C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Tsao, M. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev.* 22, 2677–2691 (2008)

Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J. Sidransky, D. A new human p53 homologue. *Nat. Med.* 4, 747–748 (1998)

van Bokhoven, H., McKeon, F. Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol. Med.* 8, 133–139 (2002)

Westfall, M.D., Joyner, A.S., Barbieri, C.E., Livingstone, M. i Pietenpol, J.A. Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha. *Cell Cycle* 4, 710–716 (2005)

Wiech, M., Olszewski, M.B., Tracz-Gaszewska, Z., Wawrzynow, B., Zylicz, M., Zylicz, A. Molecular mechanism of mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. *PLoS One* 7,51426 (2012)

Wilhelm, M., Rufini, A., Wetzel, M., Tsuchihara, K., Inoue, S., Tomasini, R., Itie-youten, A., Wakeham, A., Arsenian-henriksson, M. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev.* 24, 549–60 (2010)

Wong, K., DeDecker, B., Freund, S., Proctor, M., Bycroft, M., Fersht, A. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8438–8442 (1999)

Yang A., McKeon F. P63 and P73: P53 Mimics, menaces and more. *Mol. Cel. Biol.* 1, (2000)

Yang, A. Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Andrews, N.C., Caput, D. P63, a P53 Homolog At 3Q27–29, Encodes Multiple Products With Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Mol. Cell* 2, 305–16 (1998)

Yang, A., Kaghad, M., Caput, D., McKeon, F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* 18, 90–95 (2002)

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., McKeon, F. p63 is essential for regenerative proliferation in limb , craniofacial and epithelial development. *Letters to Nature* 398, 3–7 (1999)

Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, 99–103 (2000)

Yoshikawa, Nagashima, M., Khan, M. A., McMenamin, M. G., Hagiwara, K., Harris, C. C. Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. *Oncogene* 18, 3415–3421 (1999)

Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H., Sansome, C., Joseph, T.W. Pearl, M., Chalas, E., Moll, U.M. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J. Exp. Med.* 196, 765–80 (2002)

Zdzalik, M., Pustelny, K., Kedracka-Krok, S., Huben, K., Pecak, A., Wladyka, B., Jankowski, S., Dubin, A., Potempa, J., Dubin, G. Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell Cycle* 9, 4584–4591 (2010)

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene>, pristupljeno 17.02.2018.

[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com), pristupljeno 18.05.2017.

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 31. svibnja 1992. godine u Puli. Osnovnoškolsko obrazovanje stječem u Fažani, a srednjoškolsko u Puli nakon čega 2011. godine upisujem preddiplomski sveučilišni studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Akademski stupanj sveučilišne prvostupnice molekularne biologije stječem 2014. godine te iste godine upisujem diplomski sveučilišni studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studija sudjelujem kao demonstratorica na kolegiju „Zoologija“ te odrađujem praksu u Laboratoriju za ekotoksikologiju pri Zoologijskom zavodu. Sudjelujem i na manifestacijama „Noć biologije“ za što 2012. dobivam Posebnu rektorovu nagradu, kao i na znanstveno-popularnim manifestacijama poput „Znanstvenog piknika“ i „Noći istraživača“. Kao članica odbojkaške sekcije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta natječem se na Sveučilišnoj ligi te aktivno sudjelujem na znanstveno-sportskim susretima „Primatijada“. Laboratorijsku praksu stječem u Laboratoriju za proteinsku dinamiku pri Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković gdje izdrađujem i diplomski rad.