

Utjecaj onkoproteina E6 iz visokorizičnih sojeva humanog papiloma virusa na protein NHERF-2

Miljković, Frane

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:455958>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Frane Miljković

**UTJECAJ ONKOPROTEINA E6 IZ VISOKORIZIČNIH
SOJEVA HUMANOG PAPILOMA VIRUSA NA
PROTEIN NHERF-2**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu bakteriologiju i virologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Vjekoslava Tomaića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Prije svega, želim se zahvaliti svom mentoru Vjeki što mi je omogućio izradu diplomskog rada u najboljem laboratoriju na Ruđeru. Hvala mu na svim konstruktivnim raspravama, prijedlozima, ispravcima, pomoći oko eksperimenata i na vremenu kojeg je uložio da bi ovaj rad bio što bolji i da bi ja naučio što više radeći ga. Zaista sam puno naučio. Hvala Nini, Ivanu, Kseniji i Jasminki na kolačima i razgovorima koji su mi učinili boravak u ovom labu ugodnim i dragocjenim. Hvala šefici Magdaleni na mudrim savjetima i što se uvijek brinula jesam li gladan. Hvala Anamariji što je uvijek bila spremna poslušati moje žaljenje kada pokus ne bi uspeo (čitaj skoro svaki dan) i još važnije što me svaki put utješila i motivirala da radim dalje. Ovim putem ti želim poručiti: nemoj se živicirati, niti jedan western nije jači od tebe! Veliko hvala Nathanielu, hvala ti na vremenu koje si potrošio pokazujući mi tehnike, diskutirajući rezultate, savjetujući me i pomažući mi s eksperimentima, puno sam naučio od tebe.

Hvala svim prijateljima i kolegama koje neću nabarajati poimenice jer me strah da ću nekoga zaboraviti. Hvala što ste učinili moje vrijeme na studiju izuzetno zanimljivim, zabavnim, upečatljivim, nezaboravnim, punim smijeha... ukratko, baš takvim kakvim bi trebalo biti! Uvijek ću pamtit i ovo razdoblje života po vama i svime što smo proživljeli skupa.

Hvala mojoj najdražoj Steli što je uvijek uz mene, što me hrabri i tješi u teškim trenucima, što me svakodnevno nasmijava, što mi pomaže kada god može i ne može i što čini moj život vedrijim i sretnijim. Volim te!

Na kraju, najveća ali zaista najveća hvala mojoj mami Maji i tati Damiru. Hvala vam što mi pružili sve što mi je trebalo, ali i puno više od toga. Hvala vam na sretnom djetinjstvu, na pažnji i brizi i na neograničenoj bezuvjetnoj ljubavi. Iskoristit ću ovu priliku da se ispričam za sve živce koje sam vas koštao (i koje ću vas koštati ☺). Nitko ne može birati niti kupiti dobre roditelje, zato sam ja najsretniji čovjek na svijetu jer imam najbolje. Voli vas vaš sin Frane.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj onkoproteina E6 iz visokorizičnih sojeva humanog papiloma virusa na protein NHERF-2

Frane Miljković
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Visokorizični sojevi humanog papiloma virusa (HPV), u prvom redu HPV 16 i 18, povezani su s nastankom gotovo svih slučajeva karcinoma vrata maternice, a povezuju se i s razvojem drugih anogenitalnih karcinoma te značajnim brojem slučajeva tumora glave i vrata. Transformacija stanica inducirana HPV-om uvjetovana je nekontroliranom ekspresijom dvaju glavnih virusnih onkoproteina E6 i E7, koji stvaraju interakcije s različitim staničnim proteinima i inaktiviraju ih. Veliki broj ovih supstrata su tumorski supresori. Određena skupina tumorskih supresora koje razgrađuje E6 posjeduje PSD95/Dlg1/ZO-1 (PDZ) vezujuće domene. Veliki broj proteina s domenama PDZ uključeno je u regulaciju stanične polarnosti i unutarstanične signalizacije. E6 prepoznaje i veže se svojom PDZ vezujućom domenom za proteine koje imaju domene PDZ i uzrokuje njihovu razgradnju preko staničnih proteasoma. Protein NHERF-2 posjeduje domene PDZ te je prepoznat u preliminarnim istraživanjima kao potencijalno novo ciljno mjesto onkoproteina E6. U ovom je radu dokazano da E6 iz visokorizičnih sojeva HPV-a 16, 18 i 33 ostvaruje interakcije s proteinom NHERF-2 preko njegove domene PDZ te da je rezultat te interakcije razgradnja proteina NHERF-2 pomoću staničnog proteasomskog sustava razgradnje proteina. Uz to, pokazano je da razgradnja proteina NHERF-2 ima stimulacijski utjecaj na proliferacijski kapacitet stanice.

(49 stranica, 9 slika, 74 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HPV, karcinom vrata maternice, karcinogeneza, PDZ, PBM, proteasom, proliferacija

Voditelj: dr. sc. Vjekoslav Tomaić, naslovni docent

Ocjenitelji: dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

dr. sc. Marin Ježić, doc.

dr. sc. Maja Matulić, izv. prof. (zamjena)

Rad prihvaćen: 6. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

Influence of high risk Human papillomavirus E6 oncoproteins on NHERF-2

Frane Miljković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

High-risk Human papillomavirus (HPV) types, primarily HPV 16 and 18, cause almost 100% of cervical cancers worldwide. HPVs are also linked to other anogenital carcinomas and many of head and neck cancers. HPV induced cell transformation is driven by the uncontrolled expression of the two-major viral oncoproteins, E6 and E7, which interact and inactivate a plethora of cellular proteins. Many of these substrates are tumor suppressors. One group of tumor suppressors targeted by E6 are proteins that contain PDZ domains. Many of the PDZ-domain containing proteins are involved in the regulation of cell polarity and intracellular signalization. E6 binds to PDZ-domain containing proteins via its PDZ binding motif and degrades them at the proteasome. NHERF-2 is a PDZ-domain containing protein and in preliminary experiments was characterized as a potential novel target of E6. This graduation thesis shows that E6 from high-risk HPV types 16, 18 and 33 binds NHERF-2 and that these interactions are PDZ dependent. This results in NHERF-2 degradation in a proteasome dependent manner and biologically this is reflected in an up regulatory effect on cellular proliferation.

(49 pages, 9 figures, 74 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: HPV, cervical cancer, carcinogenesis, PDZ, PBM, proteasome, proliferation

Supervisor: Dr. Vjekoslav Tomaić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Dr. Marin Ježić, Asst. Prof.

Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof. (replacement)

Thesis accepted: September 6th, 2018

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Virusne infekcije kao uzrok kancerogeneze.....	1
1.2. Kancerogeneza uzrokovana humanim papiloma virusom.....	1
1.3. Struktura viriona i organizacija genoma HPV-a.....	3
1.4. Životni ciklus HPV-a.....	4
1.5. Suradnja onkoproteina E6 i E7 u kancerogenezi.....	5
1.6. Uloga onkoproteina E7.....	7
1.7. Uloga onkoproteina E6.....	8
1.7.1. Izbjegavanje apoptoze.....	9
1.7.2. Izbjegavanje staničnog starenja.....	10
1.7.3. Interakcija E6 s proteinima koji sadrže domene PDZ.....	11
1.8. Proteini NHERF-1 i NHERF-2.....	15
1.9. Ciljevi istraživanja.....	16
2. MATERIJALI I METODE.....	17
2.1. Rad sa staničnim kulturama.....	17
2.2. Održavanje i presađivanje stanica.....	17
2.3. Brojanje stanica.....	18
2.4. Transfekcija stanica kalcijevim fosfatom.....	18
2.5. Plazmidi.....	18
2.6. Inhibitor proteasoma.....	19
2.7. Izolacija proteina iz stanica.....	19
2.8. Mjerenje koncentracije proteina.....	19
2.9. Analiza proteina westernskom metodom otiska.....	20
2.9.1. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima.....	20
2.9.2. Prijenos proteina na membranu.....	22
2.9.3. Detekcija proteina na membrani.....	22
2.10. Test razgradnje proteina in vivo.....	23
2.11. Test proteinskih interakcija s glutation S-transferazom.....	24
2.11.1. Transformacija bakterija metodom toplinskog šoka.....	24
2.11.2. Indukcija fuzijskih proteina s GST privjeskom.....	25
2.11.3. Imobilizacija fuzijskih proteina s GST privjeskom.....	25
2.11.4. Analiza proteinskih interakcija.....	26
2.12. Mjerenje proliferacije stanica.....	26

3. REZULTATI.....	28
3.1. <i>Onkoproteini E6 iz HR sojeva HPV-a ostvaruju interakcije s proteinom NHERF-2 in vivo.....</i>	28
3.2. <i>Onkoproteini E6 iz HR sojeva HPV-a razgrađuju protein NHERF-2 uz pomoć proteasomskog sustava razgradnje.....</i>	30
3.3. <i>Razgradnja NHERF-2 uvjetovana je stvaranjem interakcije onkoproteina E6 s njegovom domenom PDZ.....</i>	32
3.4. <i>Razgradnjom proteina NHERF-2 onkoprotein E6 stimulira proliferaciju stanica...34</i>	34
4. RASPRAVA.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	42
6. LITERATURA.....	43
7. ŽIVOTOPIS	49

1. Uvod

1.1. Virusne infekcije kao uzrok kancerogeneze

Za nastanak malignog fenotipa potrebne su brojne promjene u staničnim procesima koje se zajedničkim imenom nazivaju obilježja raka (Hanahan i Weinberg 2000, 2011). Svako obilježje predstavlja biološku posljedicu onkogene promjene koja čini temelje fenotipa tumora. Primjerice, mutacije koje inaktiviraju tumorski supresor p53 uzrokuju obilježje nekontroliranog rasta i genske nestabilnosti tumorske stanice. Pojava obilježja raka povezana je s nakupljanjem onkogenih somatskih promjena koje mogu biti uzrokovane spontananim mutacijama, ali i mutacijama nastalim zbog izloženosti kancerogenima iz okoliša. Genski profil pojedinca i selektivni pritisak kojeg stvara mikrokoliš tkiva su također bitni faktori kancerogeneze.

Virusne infekcije isto mogu biti uzrok kancerogeneze te je poznato da virusi sudjeluju u nastanku 12 do 15% ukupnih slučajeva tumora u svijetu, čega 80% slučajeva otpada na zemlje u razvoju (Butel 2000; Mesri i sur. 2014). Akutne infekcije u većini slučajeva nisu uzrok malignih promjena nego su to najčešće kronične infekcije koje mogu trajati od nekoliko do više desetaka godina. Imunosni sustav ima jednu od najbitnijih uloga u nastanku karcinoma (Mesri i sur. 2014). Naime, kod nekih virusa u slučaju da imunosni sustav ne detektira i na vrijeme ne ukloni virusnu infekciju te ona prijeđe u kroničnu povećava se mogućnost nastanka malignih promjena (Dalton-Griffin i Kellam 2009). Dobar primjer za to su humani papiloma virusi (HPV) kod kojih je dugoročna infekcija glavni i najveći faktor rizika za razvoj malignosti povezanih s virusnom infekcijom.

1.2. Kancerogeneza uzrokovana humanim papiloma virusom

Otprilike 5% ukupnih slučajeva karcinoma u svijetu uzrokovano je HPV-om (Butel 2000). Svi papiloma virusi spadaju u porodicu *Papillomaviridae*, koja uključuje 16 rodova od kojih su *Alphapapillomavirus* i *Betapapillomavirus* najviše istraživani. Tipovi iz roda *Alphapapillomavirus* povezani su s razvojem tumora sluznice, a tipovi iz roda *Betapapillomavirus* sudjeluju kao kofaktori u inicijaciji nemelanomskih kožnih tumora za čiji

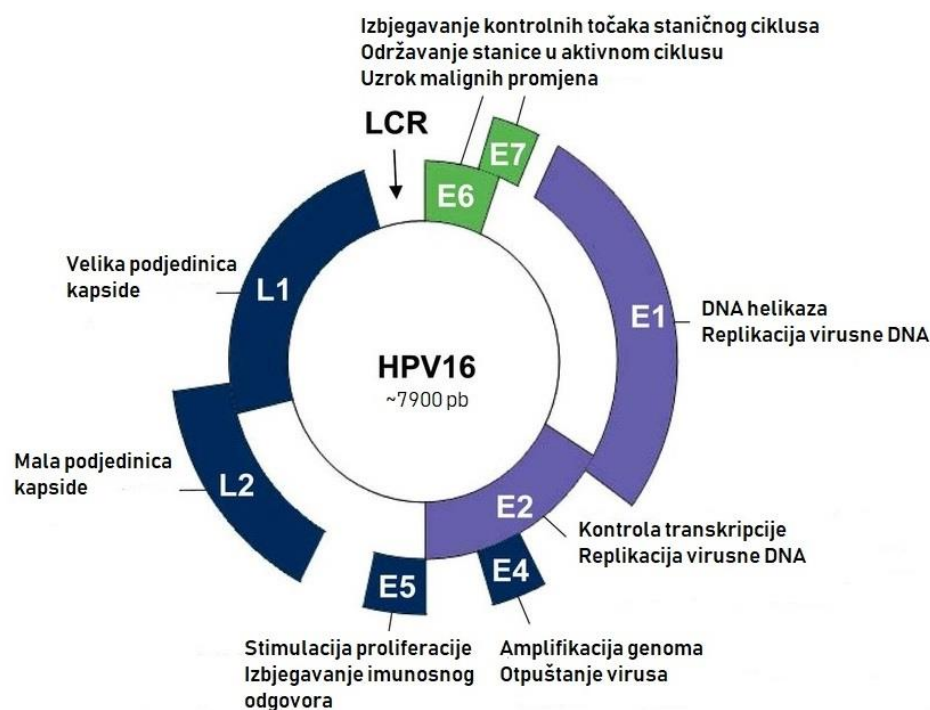
je razvoj preduvjet oštećenje uzrokovano UV svjetlom (Galloway i Laimins 2015). Rod *Alphapapillomavirus* se dalje dijeli na visokorizične (engl. *high-risk*, HR) i niskorizične (engl. *low-risk*, LR) sojeve prema sposobnosti da uzrokuju maligne promjene (IARC 2012). LR sojevi poput HPV 6 i 11 uzrokuju benigne lezije, dok su HR sojevi poput HPV 16 i 18 odgovorni za veliki broj anogenitalnih karcinoma te karcinoma glave i vrata (Tomaić 2016). Poznato je oko 200 sojeva HPV-a koji inficiraju ljude. Otprilike jedna trećina inficira pločaste stanice epitela genitalnog trakta (Moody i Laimins 2010; Tomaić 2016), pa će se većina spolno aktivnih pojedinaca tijekom života zaraziti barem jednim genotipom mukozalnog HPV-a.

Rasprostranjenost HPV-a kod ženske populacije na svjetskoj razini je oko 10%, što se odnosi na žene koje nemaju nikakve citološke promjene. Najveći postotak zaraženih nalazi se u Africi te Južnoj i Srednjoj Americi (20-30%), a najmanji u južnoj Europi (6-7%). Od svih sojeva HPV-a HR soj HPV 16 je najučestaliji u svim dijelovima svijeta, s učestalošću od 4% svih ljudi zaraženih HPV-om u Sjevernoj Americi do 2% u Europi. Drugi najučestaliji soj je također HR HPV 18. Podaci o učestalosti zaraze HPV-om su u snažnoj korelaciji s incidencijom karcinoma vrata maternice (IARC 2012). 15 visokorizičnih sojeva HPV-a su odgovorni za gotovo 100% slučajeva karcinoma vrata maternice, od čega 70% otpada na HR sojeve HPV 16 i 18. Soj 16 je najčešće uzročnik karcinoma pločastih stanica, dok soj 18 uzrokuje adenokarcinome. Sam nastanak malignih promjena je spor proces koji može trajati od jedne pa čak i do 40 godina (Mesri i sur. 2014). Karcinom vrata maternice je četvrti najučestaliji karcinom kod ženske populacije u svijetu, a čak drugi najučestaliji ako se gleda populacija od 15 do 44 godine starosti. Prema procjeni za 2012. godinu karcinom vrata maternice dijagnosticiran je kod 530 000 žena godišnje, a oko 270 000 umire od njega, dok se za blisku budućnost predviđa i više od 725 000 oboljelih godišnje (Bruni i sur. 2017).

Osim karcinoma vrata maternice HR sojevi HPV-a su odgovorni i za druge anogenitalne karcinome kao što su karcinomi stidnice, vagine, penisa i analnog područja. Također, odgovorni su za oko 30% slučajeva karcinoma glave i vrata (IARC 2012). Pušenje i konzumacija alkohola smatraju se glavnim uzročnicima karcinoma krajnika, baze jezika i ždrijela, ali u zadnje vrijeme sve je više istraživanja koja pokazuju da je HR soj HPV 16 odgovoran za nastanak značajnog broja ovih karcinoma (Bruni i sur. 2017; St. Guily i sur. 2011). Zanimljivo je da se ostali HR tipovi slabo povezuju s prethodno navedenim karcinomima, dok se u sporadičnim slučajevima pokazalo da sojevi 18, 31 i 33 mogu uzrokovati maligne promjene na spomenutim anatomskim područjima (IARC 2012).

1.3. Struktura viriona i organizacija genoma HPV-a

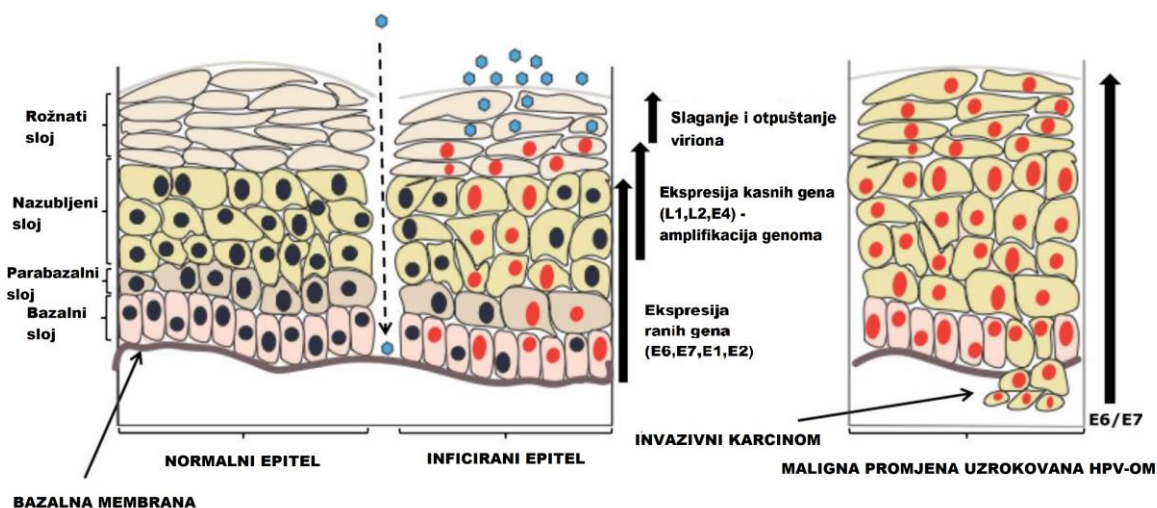
Papillomaviridae su mali virusi ikozaedrnog oblika bez ovojnice, a kapsida im je građena od 72 kapsomere sastavljenih od velike i male proteinske podjedinice. Velika podjedinica čini čak 80% ukupnih proteina virusa. Promjer viriona je od 50 do 60 nm, sadrže dvolančanu kružnu DNA molekulu veličine oko 8000 parova baza koja u interakciji sa staničnim histonima čini strukture sličnim kromatinu. Genom HPV-a u pravilu sadrži 8 otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frames*, ORF) i podijeljen je na tri regije: nekodirajuća dugačka kontrolna regija (engl. *long control region*, LCR) koja regulira ekspresiju i replikaciju virusnih gena, regija s ranim genima (engl. *early region*, E) koja kodira za proteine potrebne za replikaciju DNA, kontrolu ekspresije gena, sazrijevanje i preživljavanje virusa te regija s kasnim genima (engl. *late region*, L) koja sadrži strukturne proteine koji čine veliku i malu podjedinicu virusne kapside (IARC 2012). Slika 1 prikazuje detaljniju organizaciju genoma HPV-a i kratke opise funkcija pojedinačnih gena.



Slika 1.1. Shema organizacije genoma HPV-a na primjeru soja HPV 16. Naveden je i kratki opis funkcija pojedinačnih proteina za koje kodiraju geni virusa. Preuzeto iz D'Abramo i Archambault (2011).

1.4. Životni ciklus HPV-a

Ciljne stanice HPV-a su stanice bazalnog sloja stratificiranog pločastog epitela. Da bi se rani geni uspješno prepisivali potrebne su nediferencirane stanice domaćina koje se aktivno dijele, dok za umnažanje virusne DNA i prijepis kasnih gena stanice moraju biti diferencirane. Smatra se da su za uspješnu infekciju potrebna mikroskopska oštećenja gornjih slojeva epitela kroz koje virus lakše dolazi do bazalnog sloja jer stanice koje se nalaze u više diferenciranim suprabazalnim slojevima nisu u staničnom ciklusu tj. ušle su u G0 fazu (Moody i Laimins 2010). Nakon uspješne infekcije genomi HPV-a u stanici postoje kao ekstrakromosomski elementi tzv. episomi. Mali genom HPV-a nema gen za polimerazu koja je potrebna za replikaciju virusne DNA, zato koristi polimerazu stanice domaćina. Inficirane stanice u suprabazalnom sloju ostaju u staničnom ciklusu i nastavljaju se dijeliti te vremenom prodiru u populaciju diferenciranih stanica površinskih slojeva epitela u kojima se genom HPV-a replicira. Taj proces nazivamo amplifikacijom (Langsfeld i Laimins 2016). Nakon amplifikacije slijedi sinteza virusnih proteina i slaganje viriona. Dolaskom inficiranih stanica na površinu epitela i njihovim ljuštenjem dolazi do otpuštanja viriona (slika 1.2).

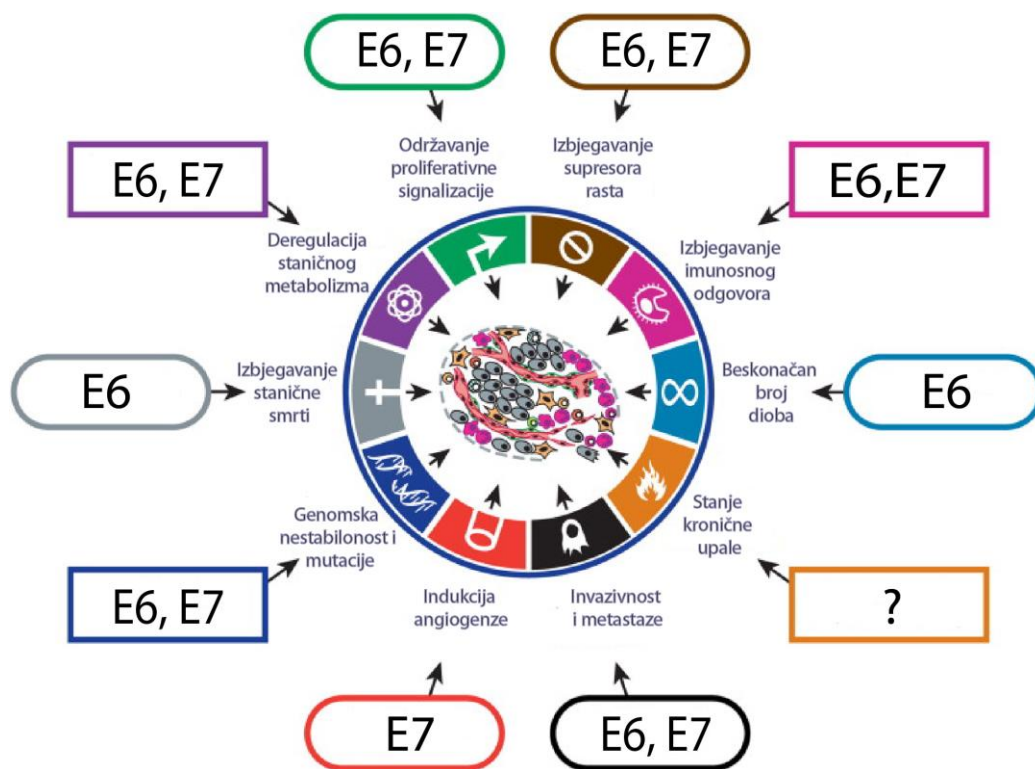


Slika 1.2. Prikaz životnog ciklusa HPV-a i maligne promjene uzrokovane dugoročnom infekcijom. S lijeve strane prikazano je kako HPV preko mikroskopskih oštećenja inficira epitel sluznice. Onkoproteini E6 i E7 razgrađuju proteine p53 i retinoblastoma protein (pRb) te tako održavaju neprestanu proliferaciju stanica. Uređenom ekspresijom prvo ranih, pa onda kasnih gena dolazi do amplifikacije virusnog genoma, slaganja i u konačnici otpuštanja novih viriona čime završava normalni životni ciklus HPV-a. Ako imunostani sustav ne razriješi infekciju i ona dugoročno ustraje, postoji opasnost nastanka malignih promjena gdje virus ne može završiti svoj životni ciklus, a onkoproteini E6 i E7 se nekontrolirano i prekomjerno ekspimiraju. Preuzeto iz Tomaić (2016).

1.5. Suradnja onkoproteina E6 i E7 u kancerogenezi

Životni ciklus HR sojeva HPV-a je u pravilu strogo reguliran i koordiniran proces. Međutim, prilikom dugotrajnih infekcija geni virusa E6 i E7 se mogu nasumično integrirati u domaćinski genom što dovodi prekida produktivnog životnog ciklusa virusa. Naime, njihovom integracijom dolazi gubitka ostalih gena virusa od kojih su neki kontrolirali njihovu ekspresiju pa se E6 i E7 nekontrolirano i prekomjerno ekspimiraju. Posljedica toga je gubitak replikacijskog kapaciteta virusa, a domaćinska stanica se nekontrolirano dijeli i poprima maligni fenotip (Tomaić 2016). U HPV pozitivnim tumorima i staničnim linijama izvedenim iz njih i godinama nakon imortalizacije ekspresija onkoproteina E6 i E7 je održana, a njihovim se utišavanjem u tim stanicama, bilo na posttranskripcijskoj ili posttranslacijskoj razini, zaustavlja rast i/ili potiče odlazak stanica u apoptozu (Tomaić 2016). Ovo ukazuje na važnost ovih dvaju onkoproteina u održavanju transformiranog fenotipa, a to se najbolje može vidjeti iz velikog broja signalnih puteva kojima E6 i E7 manipuliraju (slika 1.3). Međutim, bitno je naglasiti da održavanje malignog fenotipa nije moguće bez njihove

zajedničke suradnje. Naime, pojedinačno eksprimirani E6 i E7 ne mogu uzrokovati nastanak malignog fenotipa stanice. Smatra se da je E7 glavni pokretač stanične imortalizacije i on samostalno može uzrokovati benigne tumore, dok tek u prisutnosti E6 dolazi do stvaranja invazivnih karcinoma te se smatra da E6 na taj način doprinosi kasnijim stupnjevima maligne bolesti. To nam potvrđuju i mišji modeli karcinoma vrata maternice na kojima je pokazano da pojedinačno eksprimirani E7 povećava proliferaciju stanica, broj centrosoma te broj mikroinvazivnih karcinoma vrata maternice, dok pojedinačno eksprimirani E6 razgrađuje p53 do nedetektabilne razine, ali ne uzrokuje pojavu neoplazija niti karcinoma. Zanimljivo je da tek ekspresija oba onkoproteina uzrokuje velike i vrlo invazivne karcinome što najvjerođostojnije prikazuje proces karcinogeneze uzrokovane HPV-om kod ljudi (Riley i sur. 2003)



Slika 1.3. Onkoproteini HR sojeva HPV-a mogu sudjelovati u pojavi skoro svih glavnih karakteristika karcinoma. Na slici je prikazano koji onkoproteini sudjeluju u nastanku određene karakteristike. Preuzeto iz Mesri i sur. (2014).

1.6. Uloga onkoproteina E7

Onkoprotein E7 sadrži 98 aminokiselina, a na C kraju posjeduje domenu cinkovog prsta koja je ključna za normalnu funkciju ovog proteina. E7 sadrži tri domene CD1, CD2 i CD3 koje su odgovorne za uspostavljanje interakcija s raznim proteinima stanice domaćina. Domene CD1 i CD2 vrlo su slične malim dijelovima konzerviranih regija CR1 i CR2 proteina E1A iz adenovirusa, a CD2 je također homologna velikom T antigenu SV40 virusa. Najveći broj interakcija E7 uspostavlja sa svojim CD2 i CD3 domenama (Tomaić 2016). Onkoprotein E7 reguliran je posttranslacijski fosforilacijom i proteasomskim sustavom razgradnje proteina. Ubikvitinacija E7 odvija se pomoću ubikvitinske ligaze SCF (engl. *Skp-Cullin-F box*). Fosforilacija N kraja E7 kazeinskom kinazom II (engl. *Casein Kinase II*, CKII) bitna je za njegovu transformacijsku aktivnost (Tomaić 2016). Nadalje, CD1 domena odgovorna je za interakciju s UBR4/p600 i P/CAF (engl. *p300/CBP-associated factor*). UBR4/p600 bitan je za procese migracije i preživljenja stanice te potreban je za rast stanica bez podloge (Tomaić 2016). Smatra se da je nužan za transformaciju stanica koju uzrokuje E7 i pretpostavlja se da bi mogao igrati ulogu u replikaciji virusa (DeMasi i sur. 2005; White i sur., 2012). Virusna infekcija uzrokuje aktivaciju proteinskog kompleksa NF- κ B posredovanu P/CAF-om, E7 svojom interakcijom s P/CAF-om smanjuje aktivaciju NF- κ B i omogućuje izbjegavanje imunskog odgovora (Huang i sur. 2002).

Onkoprotein E7 domenom CD2 ostvaruje interakcije s proteinima iz *pocket protein* porodice. Oni su dio jednog od najvažnijih mehanizama koji kontrolira proliferaciju stanice i kao takvi su cilj djelovanja onkoproteina E7. Sa svim proteinima iz te skupine, p105 (pRb), p107 i p130 onkoprotein E7 iz HPV-a ostvaruje interakcije i razgrađuje ih pomoću proteasomskog sustava razgradnje (Dyson i sur. 1989). Kao posljedica razgradnje proteina pRb transkripcijski faktor E2F, kojega on inače veže i inhibira, ovime se oslobađa i aktivira. Aktivacija transkripcijskog faktora E2F zatim potiče ekspresiju gena S faze staničnog ciklusa. Proteini E7 iz svih sojeva HPV-a vežu *pocket* proteine, međutim najjače interakcije ostvaruju oni iz HR sojeva (Gage i sur. 1990). Kao što je već spomenuto HR sojevi sposobni su razgraditi p105 (pRb), p107 i p130, međutim LR sojevi sposobni su razgraditi samo p130 (Barrow-Laing i sur. 2010). Ovaj primjer ukazuje na bitne razlike u interakcijama koje ostvaruju LR i HR sojevi HPV-a te upravo te razlike doprinose mogućnosti HR sojeva da uzrokuju nastanak karcinoma.

Preko domene CD3 onkoprotein E7 ostvaruje interakcije s inhibitorima kinaza ovisnih o ciklinu p21 i p27 te utišava njihovu aktivnost kako bi se izbjeglo zaustavljanje

staničnog ciklusa uzrokovano oštećenjem DNA (Helt i Galloway 2001; Jones i sur. 1997). Također, E7 indirektno utječe na p21 preko aktivacije proteinske kinaze B koja fosforilira p21 čime se smanjuje njegova aktivnost u jezgri (Westbrook i sur. 2002). Domena CD3 dolazi u interakciju s komponentom kompleksa histonske deacetilaze Mi2 β čime dolazi do utišavanja deacetilacije i pojačane acetilacije histona. To dovodi do pojačane transkripcijske aktivnosti promotora gena E2F (Zhang i sur. 2004). E7 iz HR sojeva HPV-a dolazi u interakciju s histonskim deacetilazama (HDAC) uklanjajući ih s promotora gena kojima se tako povećava transkripcijska aktivnost (Brehm i sur. 1999; Longworth i Laimins 2004)

1.7. Uloga onkoproteina E6

Onkoprotein E6 građen je od otprilike 150 aminokiselina. Strukturnim istraživanjima razjašnjene su strukture njegovih N i C krajeva od kojih svaki sadrži po jedan motiv cinkovog prsta koji je građen od motiva CXXC (Tomaić 2016). Motivi CXXC su visoko konzervirani i prisutni u svim proteinima E6 i su vrlo bitni za njihovu normalnu funkciju. Naime, navedeni motivi odgovorni su za sposobnost onkoproteina E6 da stvara interakcije s brojnim proteinima domaćinske stanice (Martinez-Zapien i sur. 2016). Najbolji i najbitniji primjer spomenutih interakcija je ona koju onkoprotein E6 iz HR sojeva stvara s tumorskim supresorom p53 te ga uz pomoć stanične ubikvitinske ligaze E6AP (engl. *E6-associated protein*) razgrađuje preko proteasomskog sustava razgradnje. Time se sprječava inhibicija staničnog rasta u nediferenciranim, ali i u diferenciranim stanicama te dolazi do izbjegavanja ulaska u apoptozu (Moody i Laimins 2010). Osim motiva CXXC onkoprotein E6 sadrži još dva motiva kojima stvara interakcije s raznim proteinima iz stanice; to su motivi koji vežu LXXLL i PDZ domene. Pomoću LXXLL vezujućeg motiva E6 ostvaruje interakciju sa spomenutom E6AP, ali i ostalim staničnim proteinima koji posjeduju LXXLL motiv od kojih su najbitniji E6BP (engl. *E6-binding protein*) i IRF3 (engl. *Interferon Regulatory Factor 3*) (Spangle i sur. 2012). PDZ vezujući motiv je karakterističan za onkoprotein E6 iz HR sojeva HPV-a te ga LR sojevi poput sojeva 6 i 11 ne posjeduju. Pomoću tog motiva E6 ostvaruje interakcije s raznim staničnim proteinima koji posjeduju domene PDZ (Thomas i sur. 2008). Svaka interakcija koju E6 ostvaruje pomoću navedenih aminokiselinskih motiva ima određenu ulogu u životnom ciklusu virusa, ali i u procesu karcinogeneze uzrokovane virusom.

1.7.1. Izbjegavanje apoptoze

Protein p53 je jedan od najvažnijih tumorskih supresora, njegove zadaće uključuju popravak oštećene DNA, zaustavljanje staničnog ciklusa, a kod nepopravljivih oštećenja aktivaciju programirane stanične smrti. Normalna regulacija p53 povezana je s proteasomskim sustavom razgradnje i odvija se pomoću domene RING koja sadrži ubikvitinsku ligazu Mdm2 (Honda i sur. 1997). Prilikom virusne infekcije ili oštećenja DNA dolazi do višestruke fosforilacije proteina p53 koja uzrokuje njegovu stabilizaciju i dodatnu aktivaciju (Ashcroft i Vousden 1999). U stanicama karcinoma koje su zaražene HPV-om kontrolni mehanizam Mdm2 je potpuno utišan i p53 je u cijelosti kontroliran onkoproteinom E6 (Hengstermann i sur. 2001). Onkoprotein E6 iz HR sojeva HPV-a koristi nekoliko mehanizama kojima ometa funkciju tumorskog supresora p53, primarno posredujući u njegovoj razgradnji. Samostalno E6 ne može razgraditi p53, za to mu je potrebna stanična ubikvitinska ligaza E6AP, koja sadrži motiv LXXLL za koji se protein E6 veže pomoću svojih N i C terminalnih domena cinkovih prstiju. E6 i E6AP stvaraju takozvani trostruki kompleks zajedno s p53. Zatim dolazi do označavanja p53 ubikvitinskim privjeskom i razgradnje uz pomoć staničnog proteasomskog sustava razgradnje proteina (Huibregtse i sur. 1993; Scheffner i sur. 1993). Osim ključne uloge u razgradnji p53, istraživanja su pokazala da je E6AP neophodna za održavanje stabilnosti onkoproteina E6 što se vidi iz velikog broja *Alphapapillomavirus* i *Betapapillomavirus* tipova HPV-a kod kojih je to pokazano (Tomaić i sur. 2009; Thomas i sur. 2013). Strukturno istraživanje kompleksa kojeg onkoprotein E6, E6AP i p53 stvaraju, kojeg su proveli Martinez-Zapien i suradnici (2016.), pokazalo je da je motiv LXXLL E6AP ključan za interakciju E6 s p53. Zaključili su da do otvaranja veznog mjesta za p53 na onkoproteinu E6 dolazi tek nakon ostvarivanja interakcije s motivom LXXLL E6AP tako što su umjesto cijelog E6AP proteina napravili oligomer koji je sadržavao motiv LXXLL. Proučavanjem kristalne strukture kompleksa opazili su interakcije između E6 i p53. Također, u tom istraživanju otkriveno je da je mjesto vezanja onkoproteina E6 na proteinu p53 neobično i da se ne preklapa niti s DNA vezujućom domenom niti s protein vezujućom domenom proteina p53. Smatra se da je razlog tomu izbjegavanje moguće kompeticije s drugim proteinima koji stvaraju interakcije s p53 te da to omogućuje onkoproteinu E6 da stvara interakcije sa slobodnim p53, ali i s onim koji je već u interakciji s DNA ili nekim drugim proteinom (Martinez-Zapien i sur. 2016). Osim razgradnje, onkoprotein E6 uzrokuje i destabilizaciju proteina p53. Vezivanjem histonskih

acetiltransferaza p300 i CBP blokira acetilaciju proteina p53 što smanjuje njegovu stabilnost. Također, onemogućavanjem acetilacije p53 i histona jezgre nukleosoma preko p300 ne dolazi do prepisivanja gena ovisnih o interakciji acetiliranog p53 s kromatinom (Thomas i Cheng 2005).

Još jedan mehanizam neovisan o proteasomskoj razgradnji je premještanje p53 iz jezgre u citoplazmu. Čak i kada se inhibiraju proteasomi u stanicama karcinoma zaraženim HPV-om, p53 ne može pravilno djelovati jer je blokiran njegov dolazak u jezgru. Moguće je da dolazi do maskiranja jezgrinog lokalizacijskog signala proteina p53 vezanjem E6 na njegov C terminus. Također, postoje eksperimentalni dokazi da dolazi do aktivnog eksporta p53 iz jezgre u citoplazmu, ali točan mehanizam kojeg E6 koristi nije još poznat (Mantovani i Banks 2001). Direktna i indirektna interakcija, razgradnja, utišavanje ekspresije, destabilizacija i relokalizacija su načini na koji E6 ometa tumorski supresor p53. Iz svega navedenog je očito i nedvojbeno da je p53 ključno ciljno mjesto onkoproteina E6.

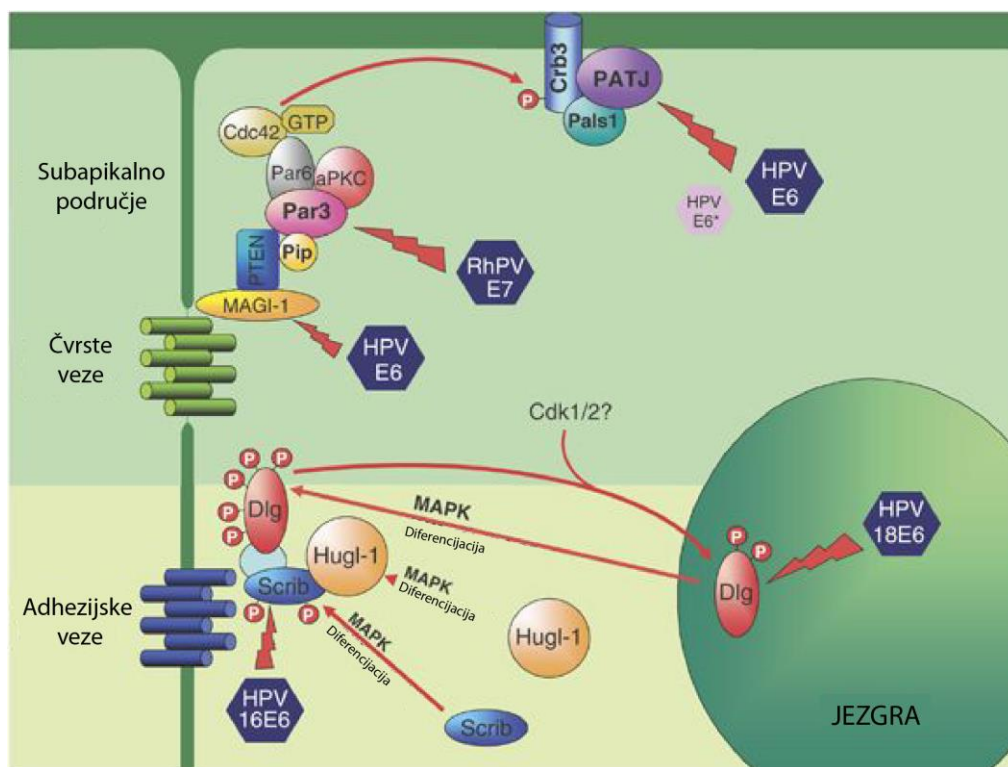
Za kraj treba još spomenuti da, iako je inaktivacija p53 najjače protuapoptotsko djelovanje onkoproteina E6, poznati su i drugi proapoptotski proteini kao što su Bak, TNFR1, Survivin i FADD, koji su njegova ciljna mjesta (Borbely i sur. 2006; Filippova i sur. 2002; Thomas i Banks 1999).

1.7.2. Izbjegavanje staničnog starenja

E6 sudjeluje u deregulaciji replikacijskog sustava stanice. Normalne stanice nakon određenog broja dioba ulaze u senescenciju te se smatra da je glavni razlog tome skraćivanje duljine telomera. Aktivacijom enzima telomeraze, kojoj je funkcija produljenje telomera kromosoma, izbjegava se ulazak u senescenciju (Shay i Wright 2004). Transkripcijskom aktivacijom katalitičke podjedinice telomeraze hTERT, E6 uspješno aktivira telomerazu u primarnim stanicama epitela (Klingelutz i sur. 1996; Veldman i sur. 2001). Nadalje, E6 stvara interakcije i s transkripcijskim faktorom c-Myc-om (Veldman i sur. 2003), dok u isto vrijeme kompleks E6/E6AP razgrađuje transkripcijski represor NFX1-91 koji se u normalnim stanicama nalazi na promotoru gena za hTERT (Xu i sur. 2008). Svima gore navedenim staničnim ciljnim mjestima E6 manipulira u svrhu izbjegavanja procesa staničnog starenja koje svojom progresijom sve više limitira replikacijski kapacitet stanica i njihovu proliferaciju. Na taj način onkoprotein E6 kroz usporavanje procesa starenja stvara pogodniju okolinu za replikaciju virusa.

1.7.3. Interakcija E6 s proteinima koji sadrže domene PDZ

Iako je razgradnja tumorskog supresora p53 najbitniji pokretač karcinogeneze pokazano je da mutanti proteina E6 iz HR sojeva koji ne mogu razgrađivati p53 ipak mogu uzrokovati immortalizaciju stanica (Liu i sur. 1999). Dakle, postoje i druga ciljna mjesta u stanici čijom inaktivacijom onkoprotein E6 doprinosi procesu karcinogeneze uzrokovane HPV-om. U tu skupinu spadaju proteini koji posjeduju domene PDZ. Domene PDZ sadrže otprilike 90 aminokiselina i glavna funkcija im je ostvarivanje međusobnih interakcija (Javier 2008). Izvor kratice PDZ potječe od prvog slova prvih triju proteina kod kojih je opisana ova domena: *post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1) i *zonula occludens-1 protein* (ZO-1). Proteine koji imaju domene PDZ dijelimo na tri glavne skupine: proteini koji imaju isključivo domene PDZ, membranske gvanilat kinaze (engl. *membrane associated guanylate kinase*, MAGUK) i proteini koji imaju domene PDZ i druge domene za ostvarivanje interakcija. Proteini iz skupine onih koji samo ostvaruju interakcije kroz domene PDZ najčešće djeluju kao proteini skele (engl. *scaffold proteins*) koji pridržavaju signalne komplekse i lokaliziraju ih na specijalizirana područja kao što su mjesta međustaničnog kontakta (engl. *adherens and tight junctions*) (Tomaić 2016). Većina navedenih proteina su tumorski supresori te su izuzetno bitni za održavanje stanične polarosti epitelnih stanica koje su glavna ciljna mjesta HPV-a (slika 1.4). Kako je gubitak stanične polarosti jedan od glavnih događaja koji omogućuju invaziju stanica karcinoma i nastanak metastaza, smatra se da je ciljanje upravo ovih proteina ključno za razvoj kasnijih stupnjeva maligne bolesti uzrokovane HPV-om.



Slika 1.4. Onkogeni papiloma virusi napadaju brojne regulatore stanične polarnosti. Shematski prikaz različitih proteina koji sudjeluju u izgradnji “superkompleksa” stanične polarnosti, a ciljna mjesta su onkoproteina iz HR sojeva papiloma virusa. Protein Scribble je ciljno mjesto onkoproteina E6 HPV soja 16, dok E6 iz soja 18 preferira protein Dlg. MAGI-1 je također ciljno mjesto onkoproteina E6 iz raznih sojeva HPV-a. PATJ supstrat je onkoproteina E6 i njegove alternativne prekrojene varijante E6*. Par3 je ciljno mjesto onkoproteina E7 iz RhPV 1. Prikazane su i posttranslacijske modifikacije za koje je poznato da pojačavaju fosforilaciju i relokalizaciju proteina, npr. akumulacija kompleksa Scrib na mjestima međustaničnih kontakata uzrokovana djelovanjem MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*). Preuzeto iz Thomas i sur. (2008).

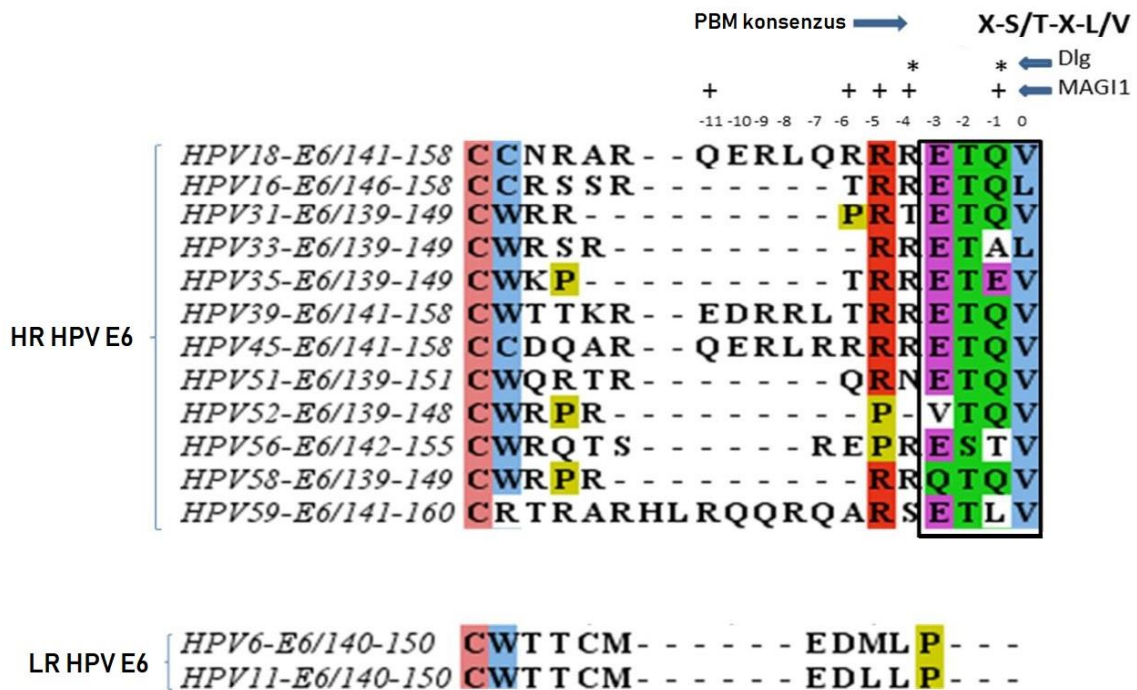
Osim veznog mjesta za E6AP, onkoproteini E6 iz svih HR sojeva HPV-a imaju očuvan slijed aminokiselina na C-kraju (Klasa I PDZ (PSD95/Dlg1/ZO-1) vezujući motiv (X-T/S-X-L/V)) kojega se naziva i domena PBM (engl. *PDZ-binding motif*) (Tomaić 2016). HR sojevi, kao što su HPV 16 i 18, preko svojih domena PBM stvaraju interakcije s brojnim proteinima koji imaju domene PDZ te ih razgrađuju istim mehanizmom kao i p53 (Thomas i sur. 2008). Važnost cjelovitih motiva PBM se pokazala u različitim aspektima životnog ciklusa virusa; mutacije domene PBM proteina E6 kod kompletnih virusnih genoma dovode do smanjenja stope replikacije virusa, smanjenog broja episoma, gubitka episoma te pojačane integracije u kromosome domaćina. PBM-PDZ interakcija je značajna i za proces karcinogeneze uzrokovane HPV-om; PBM motiv doprinosi transformaciji stanica glodavaca,

procesu epitelno-mezenhimske tranzicije, a u mišjim modelima je pokazano da PBM-PDZ interakcija povećava sposobnost E6 da u suradnji s E7 dovede do nastanka epitelnih tumora. Naime, miševi koji su imali PBM mutante onkoproteina E6 razvili su značajno manje, rjeđe i slabije maligne tumore u usporedbi s divljim tipovima (Nguyen i sur. 2003, Thomas i sur. 2008). Iz toga se vidi značaj uspostavljanja ovih interakcija za proces patogeneze uzrokovane HPV-om (Lee i Laimins 2004).

Postoji specifičnost interakcije onkoproteina E6 s proteinima koji posjeduju domene PDZ. Proteini E6 iz HR sojeva imaju različiti afinitet ostvarivanja interakcija s različitim proteinima s domenama PDZ. Primjerice onkoprotein E6 iz HPV soja 18 (18 E6) stvara jače interakcije s proteinima Dlg1 i MAGI-1 (Kiyono i sur. 1997), dok onkoprotein E6 iz HPV soja 16 (16 E6) stvara jače interakcije s proteinom hScrib (Thomas i sur. 2005). Jačina interakcije ovisi o aminokiselinskom slijedu domene PBM što je potvrđeno i proučavanjem kristalne strukture peptida homolognih C kraju proteina 18 E6. Dokazano je da se peptid različitom jačinom veže za različite domene PDZ (Liu i sur. 2007; Zhang i sur. 2007). Također, zanimljivo je da onkogeni E6 i E7 iz srodnog *Rhesus papillomavirus 1* (RhPV 1) dijele 50%-tnu homologiju s istim proteinima iz HPV 16. Međutim, kod RhPV 1 C terminalna domena PBM se ne nalazi na onkoproteinu E6 nego na E7. Aminokiselinski slijed te domene PBM je bitno različit od onoga na proteinu E6 sojeva HPV 16 i 18. Zbog toga E7 protein iz RhPV 1 najjače interakcije stvara s proteinom Par3 koji je regulator stanične polarnosti i kojeg RhPV 1 E7 također barem djelomično razgrađuje uz pomoć proteasoma (Tomaić i sur. 2009). Dakle, bez obzira na različite načine narušavanja signalnog puta stanične polarnosti, njihov cilj je isti. Iz navedenog primjera jasna je evolucijska konzerviranost interakcija virusa s proteinima koji sadrže domene PDZ te važnost tih interakcija za produktivan životni ciklus tih virusa, ali i njihov doprinos u karcinogenezi uzrokovanoj njima.

Zbog već navedenih funkcija proteina s domenom PDZ u održavanju međustaničnih kontakata, polarnosti i kontrolirane proliferacije stanica, smatra se da je sposobnost onkoproteina E6 da razgrađuje te proteine među glavnim pokretačima kasnijih faza razvoja maligne bolesti. Također, veliki broj ovih proteina spada u tumorske supresore i njihovom inaktivacijom onkoprotein E6 doprinosi kontinuiranom dijeljenju stanica (Pim i sur 2012). Iz tog razloga puno je istraživanja posvećeno razlučivanju ovog mehanizma te je do sada pronađeno više od deset ciljnih mjesta s domenama PDZ. Koje mete će određeni HR soj HPV-a ciljati isključivo ovisi o specifičnosti njegove domene PBM. Zbog malih razlika u poznatoj konsenzus sekvenci na C kraju domene PBM, protein E6 iz različitih HR sojeva

može se preferencijalno vezati za različite proteine te ih posljedično razgrađivati (slika 1.5). Jedan od primjera za to je već spomenuta sklonost soja HPV 18 za proteinom Dlg1, odnosno soja HPV 16 za proteinom hScrib. Izvor ove specifičnosti razlika je u samo jednoj aminokiselini između domena PBM ovih sojeva. Pokazano je da zamjenom spomenutih aminokiselina ujedno dolazi i do zamjene preferencijalne mete ova dva soja (Thomas i sur. 2005).



Slika 1.5. Poravnate sekvence C terminusa HR i LR sojeva HPV-a. Za razliku od LR, HR sojevi na svom C terminusu imaju konsenzus sekvencu PBM klase 1 (-X-S/T-X-L/V). Specifičnost interakcije HR sojeva HPV-a s proteinima koji imaju domenu PDZ ovisi o razlici u konsenzus sekvencama domene PBM. Međutim, ovisi i o razlici u nekim ostalim aminokiselinama koje ne spadaju u konsenzus sekvencu. Na primjeru interakcije s proteinima Dlg i MAGI-1 pokazano je da čak sedam prethodnih aminokiselina može sudjelovati u ostvarivanju interakcija. Preuzeto iz Ganti i sur. (2015).

1.8. Proteini NHERF-1 i NHERF-2

Protein NHERF-1 (engl. *sodium-hydrogen exchange regulatory cofactor 1*) i NHERF-2 (engl. *sodium-hydrogen exchange regulatory cofactor 2*) spadaju u porodicu proteina NHERF koji posjeduju domene PDZ. NHERF-1 prepoznat je kao ciljno mjesto HR onkoproteina 16 E6 HPV-a (Accardi i sur. 2011; Lau i Hall 2001). Proteinski kompleksi čiji je NHERF-1 sastavni dio sudjeluju u regulaciji migracije i oblika stanica i povezani su s razvojem karcinoma zbog interakcija koje stvaraju s receptorom za PDGF (*platelet-derived growth factor*), β -kateninom, PTEN-om i merlinom (NF-2) (Accardi i sur. 2011). HPV 16 E6 ostvaruje interakcije s proteinom NHERF-1 i razgrađuje ga uz pomoć proteasoma, a indirektno njegovom razgradnjom uključuje proteinsku kinazu B koja ima ulogu u procesima stanične proliferacije i apoptoze. Također, kako je NHERF-1 povezan s održavanjem oblika stanice i kontrolom stanične migracije, njegovom razgradnjom se ti procesi narušavaju što doprinosi razvoju karcinogeneze uzrokovane HPV-om (Accardi i sur. 2011).

U prijašnjim istraživanjima protein NHERF-2 prepoznat je kao potencijalno novo ciljno mjesto HR sojeva HPV-a. O funkciji proteina NHERF-2 poznato je da je protein skela koji povezuje proteine iz grupe *ezrin/moesin/radixin* s aktinskim citoskeletom te sudjeluje u regulaciji njihove ekspresije na površini stanice. Također, regulira aktivnost natrijske/vodikovske pumpe 3 (engl. *sodium/hydrogen exchanger 3*) bitne za kontrolu apsorbcije natrija u crijevima. Bhattacharya i suradnici (2012) su pokazali da utišavanjem proteina NHERF-2 endotelne stanice pokazuju veći proliferacijski kapacitet, što je posebno zanimljivo za ovo istraživanje.

1.9. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Provjeriti je li onkoprotein E6 iz HR sojeva HPV-a ostvaruje interakcije s proteinom NHERF-2.
- Utvrditi ostvaruju li se interakcije ovih dvaju proteina preko njihovih PBM i PDZ vezujućih motiva.
- Utvrditi dovode li ove interakcije do razgradnje NHERF-2 preko proteasomskog sustava razgradnje proteina, kao i kod ostalih supstrata onkoproteina E6 koji posjeduju domene PDZ.
- Ustanoviti utjecaj interakcija onkoproteina E6 s proteinom NHERF-2 na proliferacijski kapacitet stanica.

2. Materijali i metode

2.1. Rad sa staničnim kulturama

Sa staničnim kulturama rađeno je isključivo u kabinetu s vertikalnim protokom sterilnog zraka (engl. *laminar flow cabinet*) i HEPA (engl. *high efficiency particulate air*) filterom. Prije početka i nakon završetka rada u kabinetu, radna površina sterilizirana je izlaganjem UV svjetlu najmanje 15 minuta. Također, neposredno prije početka rada radna površina obrisana je 70%-tnim etanolom. Laboratorijski pribor, pipete i otopine korištene u laminaru bile su sterilne. Sve korištene stanične kulture rasle su u inkubatoru na 37 °C uz vlažnu atmosferu i koncentraciju ugljikovog dioksida od 10%.

2.2. Održavanje i presađivanje stanica

Stanične linije HEK 293 (engl. *human embryonic kidney cells 293*) (ATCC, SAD) i stanice karcinoma vrata maternice C33-A (ATCC, SAD) uzgajane su u posudama za staničnu kulturu promjera 10 cm (Fisher Scientific, SAD). U svaku posudu dodano je 8 mL DMEM-a (engl. *Dulbecco's modified eagle medium*) s dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 2 mM L-glutamina, 1 mM natrijevog piruvata, 100 U mL⁻¹ penicilina i 0,1 mg mL⁻¹ streptomicina. Kako bi se održala optimalna konfluentnost, obje stanične linije presađivane su svaka dva do tri dana. Prilikom presađivanja stanicama je medij uklonjen odsisavanjem, isprane su s 5 mL fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (pH = 7,4) te im je nakon ispiranja dodan 1 mL 10%-tne otopine tripsina u PBS-u, nakon čega su stavljene u inkubator na 5 minuta kako bi se stanice odlijepile od podloge. Kako bi se djelovanje tripsina zaustavilo dodano je 4 mL DMEM medija. Nakon resuspendiranja, stanice su razrijeđene deset puta i nasađene u novu posudu za staničnu kulturu.

2.3. Brojanje stanica

Nakon tripsinizacije, u posude promjera 10 cm dodano je 9 mL medija i stanice su temeljito resuspendirane. 10 μ L suspenzije naneseo je na hemocitometar. Pomoću svjetlosnog mikroskopa izbrojana su 4 velika kvadratna polja komorice. Volumen jednog kvadratnog polja korištenog Neubauer hemocitometra bio je 0,1 μ L. Broj stanica u mililitru suspenzije izračunat je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Broj stanica po mL} = (\text{ukupan broj stanica/broj polja}) \times 10\,000$$

2.4. Transfekcija stanica kalcijevim fosfatom

Jedan dan prije transfekcije $3,5 \times 10^5$ stanica nasadeno je u posude za staničnu kulturu promjera 6 cm u 2 mL medija. Tri sata prije transfekcije stanicama je promijenjen medij. U jednu mikroeprijetu dodano je 11 μ L 2,5 M CaCl_2 , 95 μ L pufera TE (pH = 7,6) i 5,5 μ g plazmidne DNA, a u drugu mikroeprijetu dodano je 100 μ L $2 \times$ HBS (engl. *HEPES buffered saline*). Sadržaj prve mikroepriete temeljito je promiješan i dodan iz zraka, kap po kap, u drugu mikroeprijetu s HBS-om. Zatim je sadržaj druge mikroepriete pipetom lagano promiješan i ostavljen 45 minuta na sobnoj temperaturi. Po jedan par mikroeprieta napravljen je za svaku eksperimentalnu skupinu stanica. Nakon toga, sadržaj mikroepriete jednoliko je nakapan po stanicama.

2.5. Plazmidi

Plazmidi korišteni za transfekciju proteina E6 iz različitih sojeva HPV-a napravljeni su kloniranjem gena za E6 u MCS (engl. *multi cloning site*) vektora pcDNA3.1 (<https://www.addgene.org/vector-database/2093/>), u koje su prethodno klonirani dva hemaglutininska (HA) privjeska i jedan privjesak FLAG, na način da se svi privjesci nalaze na N kraju E6. Tako dobiveni plazmidi nazvani su po kalupu pCAxE6, gdje je x naziv različitih sojeva HPV-a, a prazan vektor nazvan je pCA. Osim navedenih plazmida korišten je plazmid pBK-CMV-hNHERF2 koji omogućuje prekomjernu ekspresiju proteina NHERF-2

koji sadrži HA privjesak te plazmid koji sadrži gen LacZ koji kodira za protein β -galaktozidazu. Ti plazmidi nazvani su NHERF-2 odnosno LacZ.

2.6. Inhibitor proteasoma

Inhibitor proteasoma MG132 (Sigma-Aldrich, SAD) otopljen je u dimetil sulfoksidu (DMSO) te mu je konačna koncentracija bila 50 μ M. Tretman inhibitorom proveden je 5 sati. Prije dodavanja inhibitora stanicama je promijenjen medij. U svježi medij otopina inhibitora u DMSO-u dodana je u omjeru 1:1000.

2.7. Izolacija proteina iz stanica

Čitav postupak izolacije proteina izvodio se na ledu. Za sve korake centrifugiranja, centrifuga je bila ohlađena na 4 °C. Stanice su strugalicom odvojene od podloge na kojoj su rasle i prenesene skupa s medijem u hladne mikroeprevete. Suspenzija stanica je centrifugirana 3 minute na 3000 g, supernatant je uklonjen odsisavanjem, a talog stanica ispran hladnim PBS-om. Stanice su ponovno centrifugirane 3 minute na 3000 g, PBS je uklonjen odsisavanjem, a ovisno o veličini taloga dodan mu je odgovarajući volumen hladnog litičkog pufera RIPA (engl. *radio immunoprecipitation assay*) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% natrijev deoksikolat, 1% Triton X-100, 0,1% natrijev dodecilsulfat (SDS), pH = 8). Prije korištenja u litički pufer dodani su inhibitori proteaza (protease inhibitor cocktail set I, Calbiochem, SAD) u omjeru 1:100. Mikroeprevete su vorteksirane i ostavljene 15 minuta na ledu nakon čega su centrifugirane 15 minuta na 14 000 g. Supernatant koji je sadržavao otopljene proteine prebačen je u nove mikroeprevete. Izolati proteina, ako nisu odmah korišteni, pohranjeni su na -80 °C.

2.8. Mjerenje koncentracije proteina

Za mjerenje koncentracije proteina korištena je kolorimetrijska metoda temeljena na metodi po Bradfordu (Bradford 1976). Baždarna krivulja izrađena je pomoću serijskih razrijeđenja albumina iz seruma goveda (engl. *bovine serum albumine*, BSA) izvorne

koncentracije 2 mg mL^{-1} . U jažice mikrotitarske pločice serum je nanesen u sljedećim koncentracijama: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625 i $0,0078125 \text{ mg mL}^{-1}$. Duplikati uzoraka nanesen su u jažice i razrijeđeni su PBS-om u omjeru 1:5. Kao negativna kontrola korišten je PBS, a u svim jažicama konačni volumen otopine bio je $10 \text{ }\mu\text{L}$. Prije korištenja, boja za proteine Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio Rad, SAD) pomiješana je s destiliranom vodom u omjeru 1:4. U svaku jažicu dodano je $300 \text{ }\mu\text{L}$ boje. Intenzitet obojenja očitao je pomoću spektrofotometrijskog čitača mikrotitarskih pločica ELISA (Multiscan MS Labsystems, Finska) pri valnoj duljini od 595 nm .

2.9. Analiza proteina westernskom metodom otiska

Kako bi se analizirale promjene u količini proteina od interesa korištena je westernska metoda otiska. Analiza se sastoji od nekoliko koraka: razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, prijenos proteina iz gela na sintetsku membranu, sprječavanje nespecifičnog vezanja na membranu (tzv. blokiranje membrane), vezanje specifičnih primarnih i sekundarnih protutijela te detekcija i vizualizacija specifičnih proteina od interesa na membrani.

2.9.1. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima

Za razdvajanje proteina korištena je diskontinuirana, denaturirajuća, poliakrilamidna gel elektroforeza uz dodatak SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) s 5%-tnim gelom za sabijanje i 10%-tnim gelom za razdvajanje čije su otopine pripremljene prema tablici 2.1.

Tablica 2.1. Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje

Sastojak	Gel za sabijanje (5%) Volumen (mL)	Gel za razdvajanje (10%) Volumen (mL)
MiliQ H ₂ O	3,7	3,85
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	3
1 M Tris (pH 6,8)	1,7	-
Otopina 37,5% akrilamida i 1% bisakrilamida	0,8	3,5
10%-tni SDS	0,05	0,1
10%-tni APS	0,05	0,07
TEMED	0,0025	0,0035

Prije korištenja, stakla za izradu gelova isprana su destiliranom vodom i etanolom. Stakla su sklopljena u sustav za elektroforezu (Cleaver scientific, UK). Nakon dodavanja posljednje komponente, gel za razdvajanje uliven je između pripremljenih stakala. Na površinu gela nanesen je sloj izopropanola kako bi se spriječio kontakt s kisikom iz zraka koji usporava proces polimerizacije. Prije nanošenja gela za sabijanje, izopropanol je uklonjen i prostor između stakalaca dobro je obrisao filter papirom. Nakon ulijevanja gela za sabijanje, pažljivo je umetnut muški češljic za formiranje jažica. Polimerizirani gel ostavljen je na sustavu za daljnje korištenje ili je omotan u papirnate ubruse, namočen u destiliranoj vodi i spremljen u zatvorenu plastičnu posudu na 4 °C.

Češljic je uklonjen iz gela za sabijanje i sustav za elektroforezu je postavljen u odgovarajuću kadicu. Kadica je napunjena do oznake puferom za elektroforezu (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0,1% SDS). Uzorcima je dodan jednak volumen pufera za nanošenje (engl. *Laemmli buffer*, LB) početne koncentracije 2 × (4% SDS, 20% glicerol, 10% ditiotreitrol, 0,004% bromfenol plavo, 0,125 M Tris HCl, pH = 6,8). Uzorci su na termobloku zagrijani na 95 °C 5 do 10 minuta te kratko centrifugirani. Uzorci su nanošeni na gel u volumenima koji su odgovarali masi od 20 do 40 µg proteina. Kao biljeg molekulskih masa korišten je Precision Plus Protein All Blue (Bio Rad, SAD) kojega je nanoseno 2 µL u jažicu.

Elektroforeza je provedena 30 min pri konstantnom naponu od 80 V kroz gel za sabijanje te pri 120 V kroz gel za razdvajanje, sve dok pufer za praćenje tijekom elektroforeze koji sadrži boju bromfenol plavo nije došao do donjeg ruba gela.

2.9.2. Prijenos proteina na membranu

Nakon elektroforeze proteini s gela preneseni su na nitroceluloznu membranu metodom mokrog prijenosa. Za prijenos pripremljena je nitrocelulozna membrana (Amersham Protran 0,22 μm NC, GE Life Sciences, SAD) koja je izrezana tako da odgovara veličini gela za sabijanje. Zatim je napravljen sendvič oko membrane tako da je membrana postavljena na podlogu od spužvice i filter papira s jedne strane kasete. S druge strane kasete bili su postavljeni još jedna spužvica i filter papir. Membrana, spužvice i filter papiri bili su uronjeni u pufer za prijenos (184 mM Tris, 140 mM glicin, 20% metanol). Nakon elektroforeze uklonjen je gel za sabijanje, a gel za razdvajanje pažljivo je polegnut na nitroceluloznu membranu. Sendvič je preklopljen pazeći da između membrane i gela ne ostanu mjehurići zraka. Kasete je zatim stavljena na nosač u kadici koja je prethodno bila napunjena puferom za prijenos. Prijenos se odvijao pod stalnim naponom od 30 V preko noći.

2.9.3. Detekcija proteina na membrani

Nakon prijenosa, membrana je izvađena iz kasete i stavljena na blokiranje u 10%-tnu otopinu bezmasnog mlijeka u prahu u PBS-u. Blokiranje je provedeno na 37 °C, 30 minuta. Nakon blokiranja, membrana je stavljena u otopinu primarnog protutijela na tresilicu, 90 minuta na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4 °C. Zatim je ispirana 3 puta po 10 minuta puferom PBST (PBS, 0,5% Tween 20). Nakon ispiranja, membrana je prebačena u otopinu sekundarnog protutijela na tresilicu, 45 minuta na sobnoj temperaturi. Slijedilo je ponovno ispiranje 3 puta po 10 minuta s PBST-om. Za vizualizaciju membrane korišten je kemiluminiscentni supstrat (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Life Sciences, SAD). Miješanjem jednakih volumena otopine A (otopina luminola) i otopine B (otopina za oksidaciju) pripremljen je supstrat koji je zatim nanesen tako da pokriva cijelu površinu membrane. Supstrat je nakon 1 minute uklonjen papirnatim ubrusom, a membrana je zamotana u prozirne plastične korice tako da je sva tekućina s nje uklonjena. Membrana je potom prenesena u uređaj za mjerenje kemiluminiscencije Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge, UK), gdje je detektiran signal.

Sva protutijela bila su razrijeđena u 10%-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u prahu u PBST-u (PBS, 0,5% Tween 20) (tablica 2.2.). Denzitometrijska analiza membrana izvedena je u računalnom programu Fiji (Schindelin i sur. 2012) prema protokolu koji se može pronaći

na web stranici: <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j>.

Tablica 2.2. Korištena protutijela.

Ciljani protein	Naziv i porijeklo	Radna koncentracija	Izvor
Anti-HA (primarno)	H6533: monoklonsko iz miša, konjugirano s hrenovom preoksidazom	1:5000	Sigma-Aldrich, SAD
Anti-NHERF-2 (primarno)	sc-365388: monoklonsko iz miša	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti- β -gal (primarno)	Z3781: monoklonsko iz miša	1:5000	Promega, SAD
Protumišje (sekundarno)	P0260: protumišje protutijelo IgG konjugirano s hrenovom peroksidazom, iz kunića	1:1000	Dako, Danska

2.10. Test razgradnje proteina *in vivo*

Ovim testom provjereno je dolazi li do razgradnje proteina od interesa u živom sustavu, u ovom slučaju ljudskoj stanici. Stanice linije HEK 293 nasađene su i transfecirane prema već opisanom protokolu. Tablica 2.3. prikazuje plazmide korištene u ovom pokusu. 24 sata nakon transfekcije izolirani su proteini iz stanica i na njima je provedena westernovska metoda otiska prema već opisanom protokolu.

Tablica 2.3. Korišteni plazmidi u testu *in vivo* razgradnje proteina.

Naziv plazmida	Količina DNA za transfekciju (μg)
pCA16E6	4
pCA16E6ΔPBM	4
pCA18E6	4
pCA18E6ΔPBM	4
pCA11E6	4
pCA33E6	4
pCA	po potrebi
NHERF-2	1
LacZ	0,5

2.11. Test proteinskih interakcija s glutation S-transferazom

Za istraživanje proteinskih interakcija korišten je interakcijski test s glutation S-transferazom (engl. *GST pull-down assay*). Ovaj test sastoji se od nekoliko koraka: proizvodnje fuzijskog proteina s GST privjeskom u transformiranim bakterijama, imobilizacije fuzijskog proteina, inkubacije staničnog lizata koji sadrži protein od interesa s imobiliziranim fuzijskim proteinom, ispiranja nevezanih proteina, elucije proteinskih interakcijskih kompleksa i analiza istih westernskom metodom otiska.

2.11.1. Transformacija bakterija metodom toplinskog šoka

Za transformaciju su korištene bakterije *Escherichia coli* soja DH5α koje su kemijski kompetentne i čuvane na -80 °C. Bakterije su najprije odmrznute na ledu tijekom 15 minuta, a zatim je dodan 0,1 μg plazmidne DNA. Nakon toga su lagano promiješane pa inkubirane na ledu 30 minuta. Sama transformacija provedena je metodom toplinskog šoka (engl. *heat shock*) tako da su bakterije kratko inkubirane na 42 °C tijekom 2 minute, nakon čega su ostavljene 10 minuta na ledu. Potom im je dodano 100 μL medija LB (engl. *lysogeny broth*)

bez dodatka antibiotika. Uslijedila je inkubacija tijekom sat vremena na 37 °C uz laganu trešnju (450 rpm) nakon čega su transformirane bakterije nasađene na krute hranjive podloge koje su sadržavale odgovarajući antibiotik za selekciju uspješno transformiranih bakterija. Podloge s bakterijama su inkubirane na 37 °C preko noći.

2.11.2. Indukcija fuzijskih proteina s GST privjeskom

Sljedeći dan su podloge s bakterijama izvađene iz inkubatora i odabrana je jedna bakterijska kolonija koja je sterilnom drvenom čačalicom prebačena u staklenu epruvetu s 3 mL LB medija s odgovarajućim antibiotikom za selekciju. Staklene epruvete su ostavljene na 37 °C uz lagano protresanje preko dana. Kada se medij dovoljno zamutio, bakterijske tekuće kulture prebačene su u staklene tikvice od 40 mL LB medija koji je sadržavao odgovarajući selekcijski antibiotik te su ostavljene na 37 °C preko noći, uz lagano protresanje. Sljedeći dan je cjelokupna bakterijska suspenzija prebačena u staklenu tikvu s 400 mL LB medija s odgovarajućim antibiotikom. Suspenzija bakterija je ponovno inkubirana na 37 °C, uz laganu trešnju. Kada je optička gustoća mjerena na 395 nm (engl. *optical density*) tekuće bakterijske kulture dosegla 0,6 dodan joj je izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) tako da mu je konačna koncentracija bila 1 mM. Temperatura u inkubatoru smanjena je na 30 °C radi efikasnije indukcije ekspresije fuzijskog proteina od interesa.

2.11.3. Imobilizacija fuzijskih proteina s GST privjeskom

Nakon 4 sata bakterijska suspenzija centrifugirana je 10 minuta na 5500 rpm pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je bačen, a talog je resuspendiran u 10 mL otopine PBS-a s 1%-tnim Triton-X-100 koja je bila ohlađena na 4 °C. Suspenzija je zatim sonificirana na ledu 2 puta po 30 sekundi s intervalom od 30 sekundi i pri frekvenciji od 40 kHz. Suspenzija je centrifugirana na 7500 rpm, 10 minuta pri temperaturi od 4 °C. Supernatant je zatim prebačen u Falcon plastične epruvete s čepom na navoj od 15 mL te mu je dodano 300 μ L glutationskih agaroznih kuglica (Sigma-Aldrich, SAD) koje su bile prethodno rehidrirane u PBS-u. Mikroepuvete su ostavljene 90 minuta na rotirajućem kotaču pri 4 °C. Kuglice su 3 puta centrifugirane po 2 minute na 2000 rpm pri 4°C i isprane otopinom PBS-a s 1%-tnim Triton-X-100 koja je bila ohlađena na 4 °C. Nakon zadnjeg ispiranja sačuvane su u 2 mL iste

otopine s dodatkom od 20% glicerola na -80 °C. Čistoća fuzijskog proteina vezanog na glutationske agarozne kuglice provjerena je SDS-PAGE-om i bojanjem gela Coomassie plavom bojom (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 50% metanol, 10% ledena octena kiselina, 40% deH₂O).

2.11.4. Analiza proteinskih interakcija

Glutationske agarozne kuglice s vezanim fuzijskim proteinom prebačene su u mikropravu u koje je prethodno dodano 1 mL PBS-a i ostavljene su na ledu. Volumen dodanih kuglica procijenjen je prema količini vezanog proteina prethodno provjerenog na gelu. Kuglice su centrifugirane 2 minute na 2000 rpm pri 4°C i isprane hladnim nekomercijalnim standardnim puferom za imunoprecipitaciju (150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 0,25% Np-40, 50 mM HEPES, pH = 7,4). Zatim im je dodan stanični ekstrakt stanica C33-A koji je prethodno pripremljen prema već opisanom protokolu. Ekstrakt je inkubiran s kuglicama 1 sat na sobnoj temperaturi. Kuglice su 3 puta centrifugirane po 2 minute na 2000 rpm pri 4°C i isprane puferom za imunoprecipitaciju. Suspenzija ekstrakta i kuglica centrifugirana je 2 minute na 2000 rpm pri 4 °C i supernatant je uklonjen. Na kuglice dodano je 30 µL pufera za nanošenje (2 × LB). Dalje je izvođen već opisan postupak westernske metode otiska.

2.12. Mjerenje proliferacije stanica

Za mjerenje proliferacije stanica korišten je reagens UptiBlue (Interchim, Francuska), prema uputama proizvođača. Ova fluorometrijska metoda se temelji na svojstvu reagensa da fluorescira promjenom metaboličke aktivnosti stanica. Reagens je indikator promjene oksidacijskog stanja medija do koje dolazi zbog proliferacije stanica.

Šest posuda za uzgoj stanica promjera 6 cm nasadeno je i transfecirano prema već opisanom protokolu. Tablica 2.4. prikazuje plazmide korištene u ovom pokusu. 24 sata nakon transfekcije stanica, medij je uklonjen odsisavanjem, stanice su isprane PBS-om, sastrugane su te resuspendirane u svježem mediju. U triplicatima je po 190 µL suspenzije stanica nasadeno iz svake eksperimentalne skupine na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica. Mjerenje je obavljeno 48 sati nakon transfekcije. Prije mjerenja, u svaku jažicu sa stanicama dodano je 10

μ L reagensa za mjerenje proliferacije UptiBlue (Interchim, Francuska). Pločice su vraćene u inkubator na 5 sati nakon čega je izmjeren intenzitet fluorescencije za svaku jažicu. Valna duljina ekscitacije bila je od 530 do 560 nm, a emisije 590 nm. Za mjerenje intenziteta fluorescencije korišten je fluorescencijski čitač mikrotitarskih pločica Infinite 200 PRO (Tecan, Švicarska). Za obradu rezultata korišten je računalni program GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., SAD). Za svaku skupinu stanica izračunate su srednje vrijednosti \pm standardna pogreška srednje vrijednosti i provedena je jednostruka analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*) s Tukeyjevom *post-hoc* analizom. Razlike srednjih vrijednosti između skupina smatrane su statistički značajnima kada je vjerojatnost pogreške (P) bila manja od 0,05.

Tablica 2.4. Korišteni plazmidi u pokusu mjerenja proliferacije stanica.

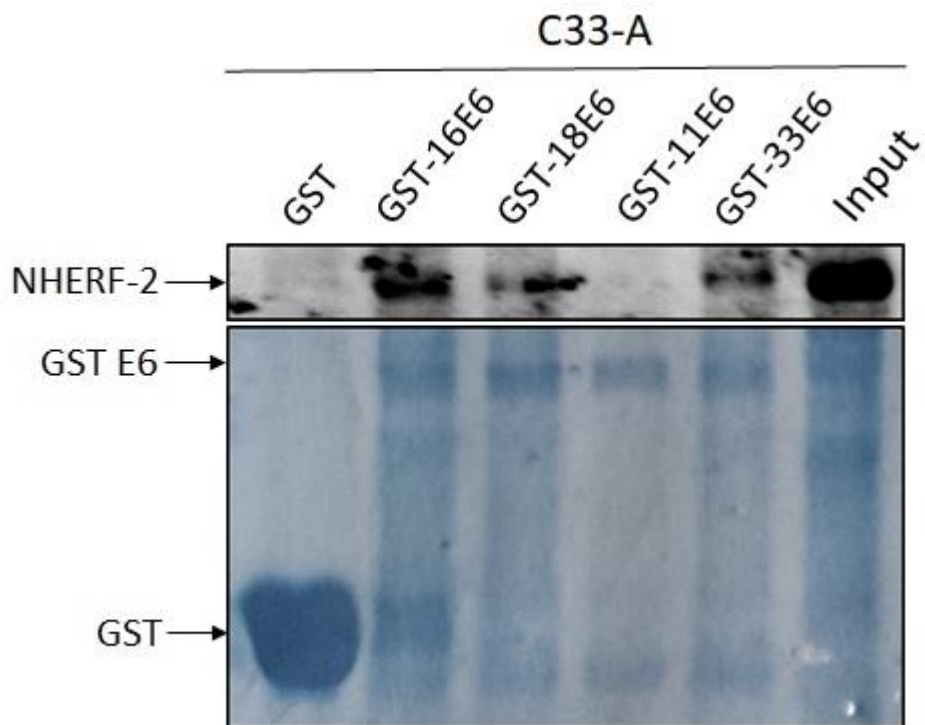
Naziv plazmida	Količina DNA za transfekciju (μ g)
pCA16E6	2
pCA16E6 Δ PBM	2
pCA18E6	2
pCA18E6 Δ PBM	2
pCA	po potrebi
NHERF-2	3
LacZ	0,5

3. Rezultati

3.1. Onkoproteini E6 iz HR sojeva HPV-a ostvaruju interakcije s proteinom NHERF-2 *in vivo*

Na temelju neobjavljenih preliminarnih istraživanja postavljena je hipoteza da onkoprotein E6 stvara interakcije s proteinom NHERF-2. Kako bi se ta hipoteza potvrdila napravljen je test proteinskih interakcija s GST-om.

Rezultati testa na slici 3.1. ukazuju da onkoproteini E6 iz HR sojeva HPV-a 16, 18 i 33 (33 E6) ostvaruju interakcije s proteinom NHERF-2, dok to nije slučaj za onkoprotein E6 iz LR soja 11. Zanimljivo je da 16 E6 ostvaruje jače interakcije s proteinom NHERF-2 nego onkoproteini E6 iz sojeva 18 i 33, koji ostvaruju interakcije otprilike jednakog, ali slabijeg intenziteta u odnosu na 16 E6. Ovaj rezultat je u skladu s poznatom činjenicom da onkoproteini E6 iz HR sojeva imaju preferirane supstrate koji sadrže PDZ domene te s njima stvaraju interakcije jačeg intenziteta. Na primjer, protein Scribble je primarno ciljno mjesto onkoproteina E6 HPV soja 16, dok E6 iz soja 18 preferira proteinDlg (Thomas i sur. 2008). Ovakvo ponašanje onkoproteina E6 objašnjava se različitim rasporedom aminokiselina motiva PBM, te je najvjerojatnije to isto slučaj kod ove interakcije.

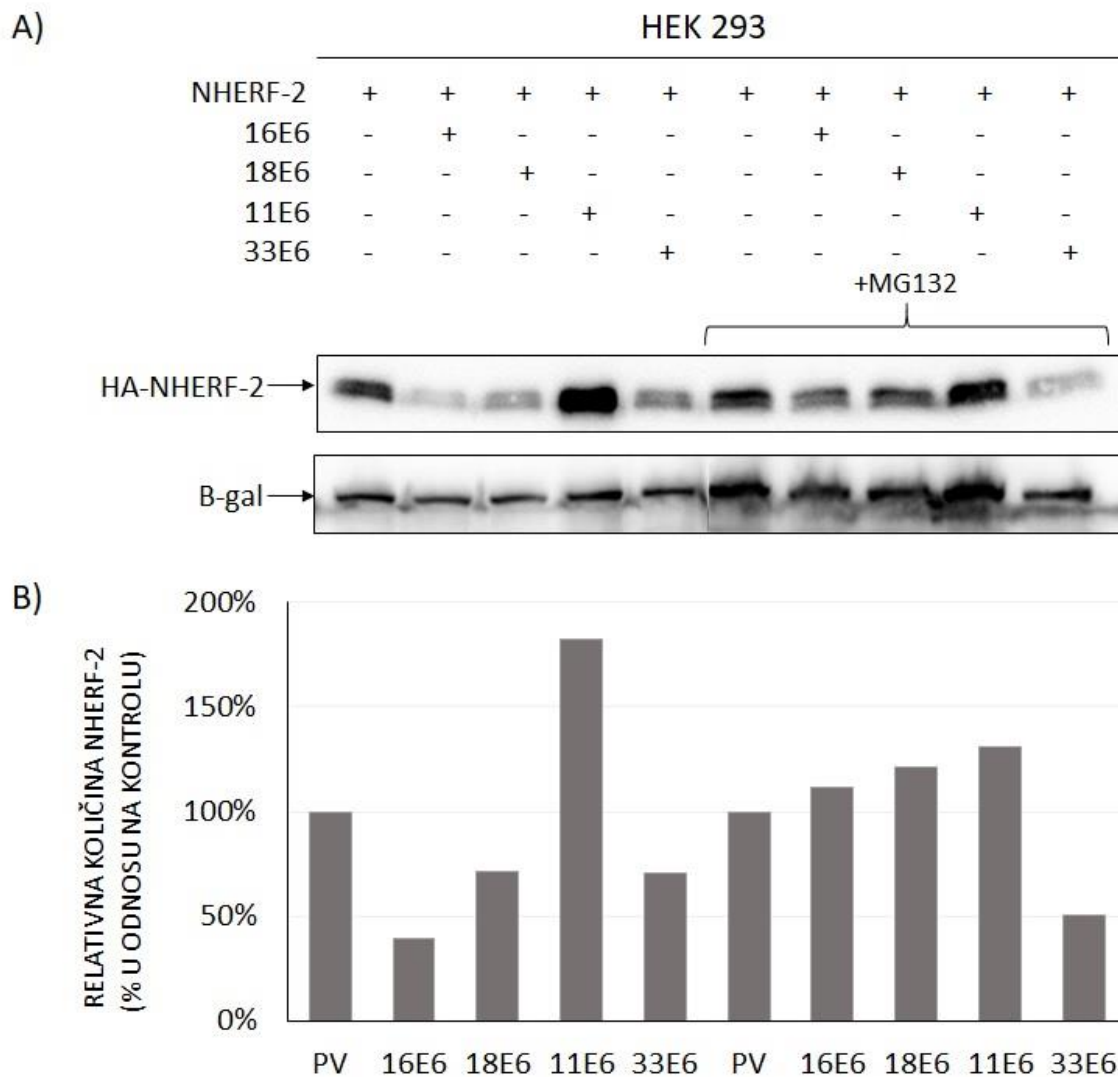


Slika 3.1. Onkoprotein E6 iz HR sojeva HPV-a 16, 18 i 33 stvara interakcije s proteinom NHERF-2 *in vivo*. Topivi stanični ekstrakt C33-A stanica inkubiran je s fuzijskim proteinima GST-16 E6, GST-18 E6, GST-11 E6, GST-33 E6 i sam GST (kontrola) 2 h na sobnoj temperaturi. S proteinima je provedena SDS-PAGE te je količina NHERF-2 povezana s različitim GST E6 proteinima određena westernskom metodom otiska koristeći protutijelo na NHERF-2. Desetina staničnog ekstrakta iz C33-A stanica korištena je kao kontrola prisutnosti proteina NHERF-2 (Input). Dolje je prikazan gel obojan Coomassie plavom bojom na kojem se vide inputi GST fuzijskih proteina.

3.2. Onkoproteini E6 iz HR sojeva HPV-a razgrađuju protein NHERF-2 uz pomoć proteasomskog sustava razgradnje

Nakon što je potvrđeno da dolazi do ostvarivanja interakcija onkoproteina E6 iz sojeva 16, 18 i 33 s proteinom NHERF-2, cilj je bio utvrditi je li posljedica ove interakcije razgradnja proteina NHERF-2 i ukoliko jest, događa li se ona uz pomoć staničnog proteasomskog sustava razgradnje. Kotransfekcijom stanica ljudske linije HEK 293 s plazmidima koji sadrže gen NHERF-2 i E6 iz različitih sojeva HPV-a provjerena je ova hipoteza u sustavu *in vivo*.

Rezultati na slici 3.2. prikazuju razgradnju proteina NHERF-2 u prisutnosti onkoproteina E6 iz HR sojeva HPV-a 16, 18 i 33, dok je razgradnja izostala u prisutnosti E6 iz LR soja 11. Denzitometrijska analiza pokazala je da se količina proteina NHERF-2 smanjila u stanicama kotransfeciranim onkoproteinom E6 iz HR sojeva HPV-a 16, 18 i 33 za 70, 30 i 30% u odnosu na kontrolne stanice kojima prilikom transfekcije nije dodan E6. U stanicama koje su bile kotransfecirane s E6 LR soja 11 nije došlo do razgradnje proteina NHERF-2 što je očekivano s obzirom da LR sojevi nemaju motiv PBM i ne mogu se vezati za proteine koje imaju domene PDZ. Kako bi se utvrdilo događa li se razgradnja proteina NHERF-2 uz pomoć staničnog proteasomskog sustava razgradnje korišten je sintetski peptidni aldehyd MG132 koji u stanicama sisavaca značajno smanjuje razgradnju proteina označenih ubikvitinskim privjescima. Kod stanica koje su bile tretirane inhibitorom proteasoma MG132 zaustavljena je razgradnja proteina NHERF-2, osim kod onih kotransfeciranih onkoproteinom E6 iz soja 33 što se pripisuje tehničkoj pogrešci. Ovi rezultati pokazuju da je 16 E6 najefikasnije razgradio NHERF-2, dok su ga 18 i 33 E6 razgradili slabije, ali međusobno podjednakim intenzitetom. Bitno je istaknuti da postoji korelacija između stupnja razgradnje proteina NHERF-2 i intenziteta vezivanja onkoproteina E6 za istoga. Također, razgradnja onkoproteinima E6 značajno je bila usporena u prisustvu inhibitora proteasoma MG132, što ukazuje da je razgradnja posredovana proteasomom.



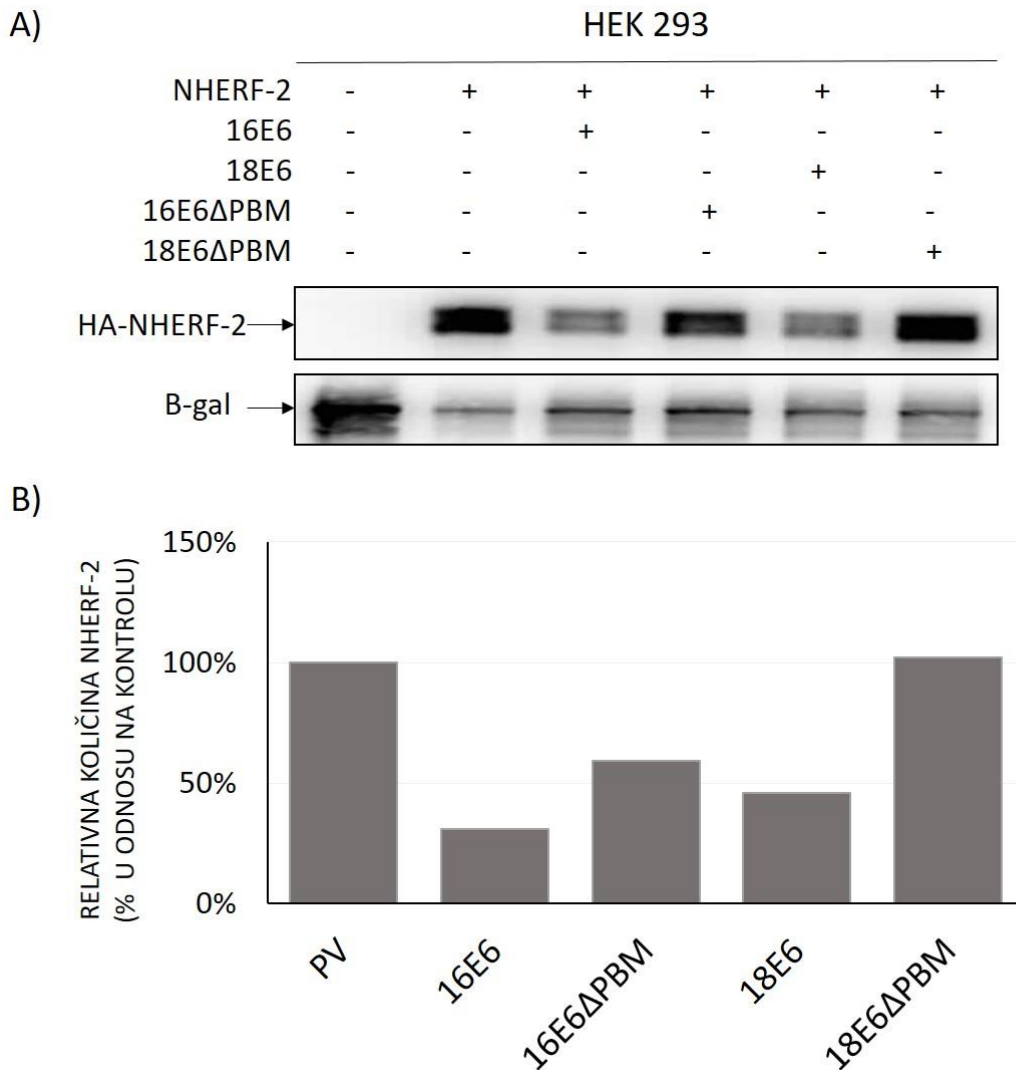
Slika 3.2. Onkoprotein E6 iz sojeva 16, 18 i 33 HPV-a razgrađuje protein NHERF-2 *in vivo*.

A) HEK 293 stanice su bile transfecirane s HA-NHERF-2, HA-16 E6, -18 E6, -11 E6 i -33 E6 individualno ili u kombinaciji. Nakon 24 sata jednaki broj stanica inkubiran je 5 sati s inhibitorom proteasoma MG132 prije liziranja. Količine proteina NHERF-2 analizirane su westernskom metodom otiska koristeći protutijelo na HA privjesak. β -gal je korišten kao indikator uspješnosti transfekcije. B) Denzitometrijska analiza provedena je nad proteinskim vrpcama, intenziteti su prikazani kao razlike u postotcima u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje su bile transfecirane praznim vektorom umjesto vektorom s E6. Oznaka PV znači prazan vektor.

3.3. Razgradnja NHERF-2 uvjetovana je stvaranjem interakcije onkoproteina E6 s njegovom domenom PDZ

Kako bi se dodatno potvrdilo ovisi li razgradnja NHERF-2 o stvaranju interakcije između domene PBM onkoproteina E6 i njegove domene PDZ napravljen je još jedan test razgradnje *in vivo*. U ovom pokusu su osim HR sojeva 16 i 18 korišteni mutanti onkoproteina E6 iz istih sojeva koji nemaju domenu PBM. Mutantima nedostaju četiri aminokiseline na C kraju E6: 155E, 156T, 157Q i 158L u slučaju onkoproteina 16 E6, a 155E, 156T, 157Q i 158V u slučaju onkoproteina 18 E6.

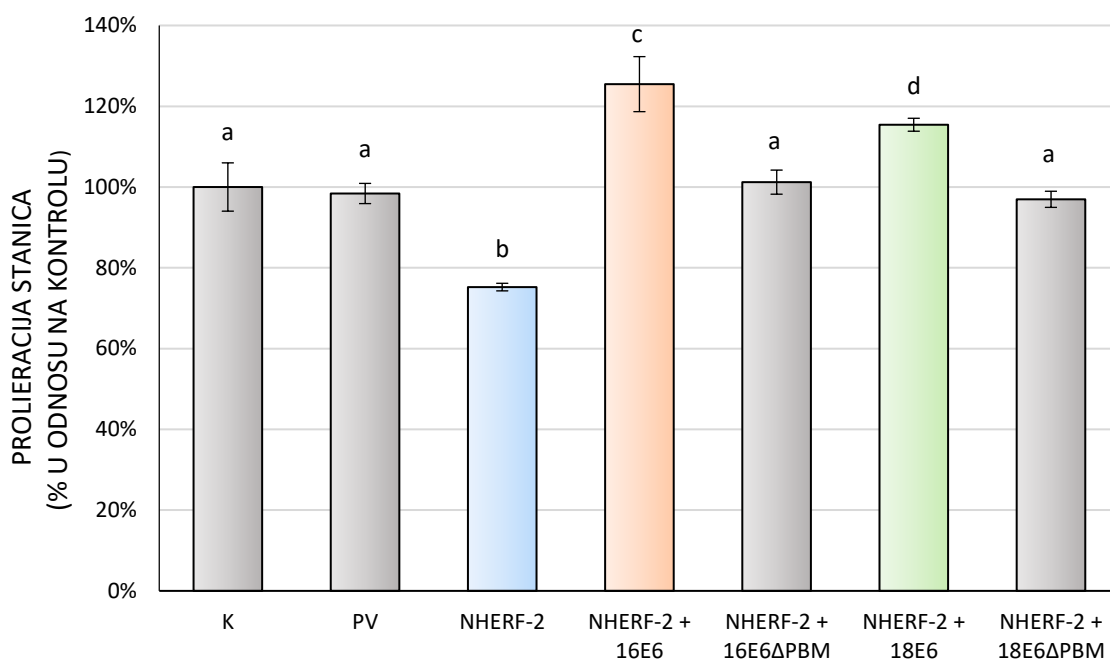
Rezultati na slici 3.3. A pokazuju razinu NHERF-2 proteina u prisutnosti navedenih onkoproteina E6 i odgovarajućih mutanata te je vidljivo da je količina proteina NHERF-2 smanjena u stanicama kotransfeciranim onkoproteinom E6 iz HR sojeva HPV-a 16 i 18. Na slici 3.3. B to je potvrđeno i kvantificirano denzitometrijskom analizom te je vidljivo da je došlo do smanjenja količine proteina NHERF-2 za 70% u slučaju soja 16 i za 55% u slučaju soja 18 u odnosu na kontrolne stanice kojima nije dodan E6. U stanicama kotransfeciranim mutantima onkoproteina E6 razgradnja NHERF-2 bila je smanjena za 30% u odnosu na divljeg tipa 16 E6, a 45% u odnosu na divljeg tipa 18 E6. Ovi rezultati jasno ukazuju da onkoproteini E6 iz HR sojeva 16 i 18 razgrađuju protein NHERF-2, ali različitom učinkovitošću. Razgradnja je posredovana motivom PBM onkoproteina E6 što je vidljivo iz rezultata gdje Δ PBM mutanti jednog i drugog onkoproteina značajno slabije razgrađuju NHERF-2. I ovdje se može vidjeti korelacija između stupnja razgradnje proteina NHERF-2 i intenziteta kojim se određeni onkoprotein E6 veže za njega. Kako kod Δ PBM mutanta 18 E6 uopće nema razgradnje NHERF-2 vjerojatno je da prilikom njegove interakcije s NHERF-2 sudjeluju samo 4 aminokiseline PBM motiva, dok kod 16 E6 delecijom PBM motiva i dalje dolazi do djelomične razgradnje NHERF-2 što ukazuje na to da aminokiseline izvan navedenog motiva doprinose u stvaranju interakcije između 16 E6 i NHERF-2.



Slika 3.3. Onkoproteini E6 iz sojeva HPV-a 16 i 18 razgrađuju protein NHERF-2 *in vivo* ostvarivanjem PBM-PDZ interakcije. A) HEK 293 stanice su bile transfecirane s HA-NHERF-2, HA-16 E6, -16 E6 Δ PBM -18 E6 i -18 E6 Δ PBM individualno ili u kombinaciji. Nakon 24 sata stanice su lizirane i količine proteina NHERF-2 analizirane su westernskom metodom otiska koristeći protutijelo na HA privjesak. β -gal je korišten kao indikator uspješnosti transfekcije. B) Denzitometrijska analiza provedena je nad proteinskim vrpčama, intenziteti su prikazani kao razlike u postotcima u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje su bile transfecirane praznim vektorom umjesto vektorom s E6. Oznaka PV znači prazan vektor.

3.4. Razgradnjom proteina NHERF-2 onkoprotein E6 stimulira proliferaciju stanica

U literaturi je pronađeno da NHERF-2 ima ulogu u kontroli proliferacije stanica. Kako bi se ta tvrdnja potvrdila i da bi se istražilo ima li E6 preko razgradnje proteina NHERF-2 utjecaj na kontrolu proliferacije stanica proučavan je utjecaj prekomjerno eksprimiranog proteina NHERF-2 na proliferacijski kapacitet HEK 293 stanica u prisutnosti i odsutnosti 16 i 18 E6 te odgovarajućih Δ PBM mutanata. Za to je korištena fluorimetrijska metoda koja se temelji na svojstvu reagensa da fluorescira povećanjem proliferacijske aktivnosti stanica. Rezultati mjerenja prikazani su na slici 3.4. kao relativna promjena u apsorbciji izražena u postocima u odnosu na kontrolnu skupinu stanica koje nisu bile podvrgnute postupku transfekcije. Proliferacijski kapacitet stanica koje su prekomjerno eksprimirale samo protein NHERF-2 bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu. Proliferacijska aktivnost stanica s prekomjerno eksprimiranim onkoproteinom E6 iz sojeva 16 i 18 je bila značajno povećana u odnosu na kontrolu te za čak 50% veća u odnosu na stanice koje su prekomjerno eksprimirale samo NHERF-2. Stanice s Δ PBM mutantima onkoproteina E6 iz sojeva 16 i 18 proliferirale su slično kao i kontrolne stanice. Dakle, uočeno je znatno smanjenje proliferacijske aktivnosti stanica s prekomjerno eksprimiranim NHERF-2, ali uz prisutnost onkoproteina E6 iz sojeva 16 i 18 ne samo da je došlo do poništavanja navedenog efekta nego su stanice proliferirale značajno više u usporedbi s kontrolnim stanicama. Međutim, stanice koje su uz NHERF-2 imale ektopijski eksprimirane 16 i 18 E6 Δ PBM mutante nisu pokazale povećanu proliferaciju u odnosu na kontrolu, ali je došlo do poništenja efekta smanjenja proliferacije koju je sam NHERF-2 imao. Iz navedenoga je jasno da protein NHERF-2 kontrolira proliferaciju stanica, a onkoprotein E6 vjerojatno ne isključivo, ali barem djelomično njegovom razgradnjom povećava proliferacijsku aktivnost stanica. Također, vidljivo je da su rezultati proliferacijskog testa u skladu s pokusima razgradnje te se mogućnost testiranih onkoproteina E6 da razgrade protein NHERF-2 izravno odrazila i na njihovu sposobnost da smanje učinak proteina NHERF-2 na inhibiciju proliferacije stanica. Prema tome 16 E6 je više smanjio učinak NHERF-2 na inhibiciju proliferacije stanica od 18 E6, a Δ PBM mutanti su znatno slabije djelovali od cjelovitih onkoproteina 16 i 18 E6.



Slika 3.4. Razgradnjom proteina NHERF-2 onkoprotein E6 povećava proliferacijski kapacitet stanica. Stanice HEK 293 transfecirane su plazmidima NHERF-2, E6 i ΔPBM mutantima iz sojeva 16 i 18. 48 sati nakon transfekcije stanicama je dodan reagens koji fluorescira u prisutnosti proliferirajućih stanica. Proliferacija stanica različitih eksperimentalnih skupina prikazana je kao postotak proliferacije u odnosu na kontrolnu skupinu netransfeciranih stanica koja je normalizirana na 100%. Proliferacija je mjerena za šest replika iz svake skupine i rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška, slova a,b,c i d označavaju skupine koje se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0.05$). PV je oznaka za stanice transfecirane praznim vektorom.

4. Rasprava

Brojna istraživanja dokazala su da onkoprotein E6 iz HR sojeva HPV-a stvara interakcije i potiče razgradnju proteina koji imaju domene PDZ. Primjerice, protein hScrib je primarno ciljno mjesto HPV 16 E6 (Thomas i sur. 2005), a proteini Dlg1 i MAGI-1 su glavne mete HPV 18 E6 (Gardiol i sur. 1999; Kranjec i sur. 2014). Razgradnjom ovih proteina HR sojevi HPV-a preuzimaju kontrolu nad polarnošću i proliferacijom stanica domaćina (Thomas i sur. 2008). Onkoprotein E6 iz LR sojeva HPV-a ne sadrži PDZ vezujući motiv, dok gotovo svi HR sojevi posjeduju PDZ vezujući motiv klase I što upućuje na to da je interakcija E6 s proteinima koji imaju domene PDZ obilježje HR sojeva i ima ključnu ulogu u karcinogenezi uzrokovanoj HPV-om. Činjenica da delecijom PDZ vezujućeg motiva HPV 16 E6, 18 E6 i srodnog HR RHPV 1 E7 dolazi do značajnog smanjenja transformacije domaćinskih stanica dodatno podupire ovu tvrdnju (Nguyen i sur. 2003; Watson i sur. 2003; Tomaić 2009).

U ovom radu okarakterizirana je nova interakcija onkoproteina E6 iz HR sojeva HPV-a s proteinom NHERF-2 koji sadrži domene PDZ i sudjeluje u raznim staničnim procesima, uključujući staničnu signalizaciju i kontrolu proliferacije. Kao i kod već opisanih interakcija s proteinima koji sadrže domene PDZ, za razgradnju proteina NHERF-2 E6 koristi stanični proteasomski sustav razgradnje proteina (Thomas i sur. 2008). U ovom radu to je potvrđeno potpunim prekidom razgradnje proteina NHERF-2 u prisutnosti onkoproteina E6 iz HR sojeva HPV-a 16 i 18 uz dodatak inhibitora staničnog proteasoma MG132. U slučaju rezultata za HPV 33 E6 vjerojatno je došlo do pogreške prilikom dodavanja inhibitora proteasoma pa bi se taj pokus trebao ponoviti. Međutim, nema razloga da u slučaju onkoproteina 33 E6 ne dolazi do razgradnje proteina NHERF-2 pomoću proteasomskog sustava razgradnje kao što je slučaj kod 16 i 18 E6. Naime, 16 i 33 su vrlo srodni sojevi, a i u literaturi dosada ne postoji slučaj da divlji tip HR onkoproteina HPV-a razgrađuje proteine s domenama PDZ bez korištenja proteasomskog sustava razgradnje (Thomas i sur. 2008). Vrlo je vjerojatno da E6 za razgradnju koristi staničnu ubikvitinsku ligazu E6AP kao što je to i u ostalim dosada opisanim slučajevima razgradnje proteina koji posjeduju domene PDZ posredovane onkoproteinom E6. Međutim, kako bi se to eksperimentalno potvrdilo u planu su pokusi koji bi koristili stanice linije HEK 293 u kojima je CRISPR/Cas tehnologijom utišana E6AP te bi se u tim stanicama ektopijski ekspimirao sam E6 i E6 u kombinaciji s E6AP i pratila bi se razlika u razini ekspresije samog onkoproteina E6, ali i intenzitet

razgradnje proteina NHERF-2 u prisustvu i odsustvu E6AP.

Interakcija koju onkoprotein E6 stvara s proteinom NHERF-2 je ovisna o PDZ vezujućem motivu što potvrđuju i rezultati ovog rada jer su onkoproteini E6 iz HR sojeva 16, 18 i 33 koji posjeduju PDZ vezujući motiv uspostavili interakcije i potaknuli razgradnju proteina NHERF-2, dok E6 iz LR soja 11 nije potaknuo razgradnju niti je ostvario interakciju s njim. Također, Δ PBM mutanti 16 i 18 E6 značajno su slabije potaknuli razgradnju protein NHERF-2. Poznato je da i male razlike od čak samo jedne aminokiseline u PDZ vezujućem motivu E6 mijenjaju njegov afinitet za različite proteine koji sadrže domene PDZ (Thomas i sur. 2008). Iz rezultata ovog rada vidljivo je da HPV 16 E6 stvara značajno snažnije interakcije s NHERF-2 i da ga efikasnije razgrađuje od HPV 18 i 33 E6. Treba napomenuti da je osim za četiri kanonske aminokiseline koje čine PDZ vezujući motiv, prepoznat i značaj dodatnih aminokiselina na C kraju E6. Smatra se da do 7 ostalih aminokiselina može sudjelovati u ostvarivanju interakcije onkoproteina E6 i proteina koji imaju domene PDZ (Ganti i sur. 2015). Ovim saznanjem bi se mogla objasniti i djelomična razgradnja NHERF-2 u prisutnosti Δ PBM mutanata 16 i 18 E6 kojima iako nedostaju četiri kanonske aminokiseline PDZ vezujućeg motiva prisutne su ostale koje vjerojatno ipak ostvaruju slabije interakcije s domenama PDZ proteina NHERF-2. Kako bi se ova tvrdnja dalje istražila mogao bi se napraviti sličan pokus kao što je opisan u radu Thomas i sur. (2005) gdje su potvrdili da zamjenom PBM motiva onkoproteina 16 i 18 E6 dolazi i do zamjene preferencijalnog ciljnog mjesta tih dvaju onkoproteina te je 16 E6 s PBM motivom 18 E6 stvarao jače interakcije s preferiranom metom 18 E6 proteinom Dlg1, a 18 E6 s PBM motivom 16 E6 je snažnije interakcije stvarao s glavnom metom 16 E6 proteinom hScribble. Dakle, predložio bih da se naprave pokusi u kojima bi se ponovno zamijenili PBM motivi ovih dvaju sojeva i provjerilo dolazi li do razlike u jačini stvaranja interakcije s proteinom NHERF-2 te očituje li se to i na intenzitetu njegove razgradnje.

Protein NHERF-2 sudjeluje u kontroli proliferacije stanica, Bhattacharya i sur. (2012) dokazali su da prekomjernom ekspresijom NHERF-2 u endotelnim stanicama dolazi do značajnog smanjenja proliferacije. Također, dokazali su da utišavanjem NHERF-2 u mišjim modelima dolazi do gotovo 50%-tnog povećanja mase induciranih tumora u odnosu na kontrolne miševe. U ovom radu pokazano je da NHERF-2 sudjeluje u kontroli proliferacije stanica HEK 293. Uz prekomjernu ekspresiju NHERF-2 u stanicama, njihova poliferacija se značajno smanjila, dok prisutnost 16 i 18 E6 nije samo poništila taj efekt, nego je došlo i do bitnog povećanja proliferacijske aktivnosti stanica. Dakle, osim prekomjerno ekspimiranog proteina NHERF-2 vrlo je vjerojatno došlo do razgradnje endogenog proteina čime se

stanicama proliferacijska aktivnost dodatno povećala. Međutim, u ovom slučaju se ne može isključiti mogućnost da je onkoprotein E6 djelovao i na neke druge kontrolne mehanizme stanične proliferacije, ali može se sa sigurnošću reći da je efekt barem djelomično ovisan o proteinu NHERF-2. U prisutnosti Δ PBM mutanata 16 i 18 E6 došlo je do djelomičnog smanjenja antiproliferacijskog efekta proteina NHERF-2, što je i očekivano s obzirom da mutanti s manjom učinkovitošću razgrađuju NHERF-2. Kao što se i u testovima razgradnje za 16 E6 moglo primijetiti, čini se da ipak dolazi do ostvarivanja barem djelomične interakcije preostalih aminokiselina oko PDZ vezujućeg motiva na C kraju Δ PBM mutanata i proteina NHERF-2 čime dolazi do njegove djelomične razgradnje. Zbog toga dolazi i do djelomičnog poništenja efekta smanjenja proliferacijske aktivnosti stanica s prekomjerno eksprimiranim proteinom NHERF-2. Sposobnost proteina NHERF-2 da kontrolira proliferaciju stanica je vjerojatno glavni razlog zašto je on ciljno mjesto onkoproteina E6. Kako je već dokazano da utišavanjem NHERF-2 dolazi do rasta tumora podrijetlom iz endotelnih stanica (Bhattacharya i sur. 2012), a poznato je da je razgradnja velikog broja proteina s domenama PDZ preduvjet za razvoj kasnijih stadija karcinogeneze uzrokovane HPV-om (Thomas i sur. 2008), izgledno je da je i razgradnja proteina NHERF-2 posredovana onkoproteinom E6 iz HR sojeva još jedan važan faktor u nastanku malignih promjena. Kako su epitelne stanice primarni domaćin HPV-a, trebao bi se bolje provjeriti utjecaj proteina NHERF-2 na njihov proliferacijski kapacitet. Iako je ovdje rađeno s HEK 293 stanicama koje se smatraju epitelima, one posjeduju i karakteristike nekih drugih staničnih tipova te postoje i bolji modeli ljudskih epitelnih stanica koji bi se mogli koristiti da bi se dodatno potvrdila ova opažanja. NHERF-2 koprecipitira s membranskom ionskom pumpom Ca^{2+} -ATPaze (PMCA) i sudjeluje u njezinoj aktivaciji u neuronima i epitelnim stanicama (Kruger i sur. 2008). Bhattacharya i sur. (2012) su pretpostavili da prilikom nedostatka NHERF-2 dolazi do blokiranja ove pumpe i zadržavanja Ca^{2+} iona u citosolu. Posljedica povećane koncentracije citosolnog Ca^{2+} je pojačana ekspresija c-Myc-a (Salehi u sur. 1990), a c-Myc je poznati aktivator proliferacije stanica i promotor staničnog ciklusa. Pri njegovoj pojačanoj aktivnosti dolazi do represije promotora p27 (Yang i sur. 2001) i indukcije ekspresije ciklina D1, koji dodatno utišava p27 (Sherr i Roberts. 1999). Također, c-Myc potiče ekspresiju Cullina 1 (O'Hagan i sur. 2000) i 1B podjedinice kinaze ovisne o ciklinu koji sudjeluju u razgradnji proteina p27 (Keller i sur. 2007). Zanimljivo je da dosada ne postoje dokazi da onkoprotein E6 direktno može djelovati na p27 te je moguće da onda indirektno djeluje na njega upravo preko NHERF-2. To bi se dalje moglo istražiti korištenjem degradacijskog testa *in vivo* u kojem bi se prekomjerno eksprimirao protein NHERF-2 u kombinaciji s 16 i 18 E6 te

njihovim Δ PBM mutantima i onda pratiti promjene u količini proteina ciklina D1, CDK4 i p27. Nadalje, mogao bi se napraviti pokus u kojem bi se koristila siRNA (engl. *small interfering RNA*) tehnologija kojom bi se u HeLa stanicama koje imaju integrirane sekvence HPV 18 E6 i E7 i u CaSki stanicama koje imaju integrirane sekvence HPV 16 E6 i E7 utišali E6 i NHERF-2 pojedinačno i u kombinaciji te bi se također promatrao utjecaj na razinu proteina ciklin D1, CDK4 i p27. Također, slično kao i s endotelnim stanicama mogao bi se provjeriti utjecaj utišavanja NHERF-2 na inducirane tumore podrijetlom iz epitelnih stanica u mišjim modelima.

Najveći broj proteina koji imaju domene PDZ, a mete su onkoproteina E6 iz HR sojeva HPV-a spadaju u skupinu proteina MAGUK. Međutim, i drugi proteini koji imaju domene PDZ mogu biti mete onkoproteina E6. Na primjer, protein NHERF-1 koji je zajedno s NHERF-2 dio obitelji NHERF proteina, za kojeg su Accardi i sur. (2011) pokazali su da je ciljno mjesto onkoproteina E6 iz HR soja 16 te da je njegova razgradnja također posredovana staničnim proteasomskim sustavom razgradnje proteina. Kao i u slučaju NHERF-2 interakcija E6 i NHERF-1 ovisna je o PDZ vezujućem motivu na C kraju E6 te ga Δ PBM mutant 16 E6 nije mogao razgraditi. Iako se PDZ vezujući motivi 16 i 18 E6 razlikuju u samo jednoj aminokiselini, 18 E6 nije mogao stvoriti interakcije s NHERF-1. Mutacijom V158L PDZ vezujući motiv 18 E6 postaje jednak motivu 16 E6 te kao takav može vezati proteine koje imaju domene PDZ, a specifična su ciljna mjesta 16 E6 (Thomas i sur. 2005). U prisutnost navedenog mutanta 18 E6 također nije došlo do razgradnje NHERF-1 (Accardi i sur. 2011). Mogući uzrok tome može biti različiti raspored aminokiselina u domenama PDZ proteina NHERF-1 i NHERF-2. U slučaju proteina NHERF-1 prvi puta je zabilježena suradnja onkoproteina E6 i E7 u razgradnji proteina koji ima domene PDZ (Accardi i sur. 2011). Naime na membrani nakon inkubacije protutijelom za NHERF-1 Accardi i sur. opazili su dvije vrpce od kojih gornja pripada hiperfosforiliranom proteinu NHERF-1. Smatraju da E7 aktivacijom kinaza ovisnih o ciklinu povećava količinu hiperfosforiliranog oblika koji je bolji supstrat za E6 te se time pospješuje razgradnja proteina NHERF-1. U ovom radu opažena je pojava druge vrpce prilikom korištenja protutijela za protein NHERF-2, međutim pojava nije konzistentna i zbog toga nije dalje istraživana. Iako činjenica da NHERF-1 stvara interakcije isključivo s 16 E6, a NHERF-2 i s 18 i 33 E6 upućuje na to da se radi o nešto različitim interakcijama i potencijalno drugim proteinima koji još sudjeluju u njima, mogla bi se u budućnosti provesti daljnja istraživanja i provjeriti doprinosi li i onkoprotein E7 u razgradnji proteina NHERF-2.

Ciljna mjesta onkoproteina HPV-a i drugih malih DNA onkovirusa koji uzrokuju kancerogenezu su većinom proteini koji sudjeluju u procesima održavanja stanične polarnosti, kontrole proliferacije stanica i staničnog ciklusa (Banks i sur. 2012). Navedeni proteini često čine velike komplekse i njihova je funkcija rijetko jednoznačna. Važnost ovih istraživanja nije samo u otkrivanju novih mehanizama koji bi mogli poslužiti kao baza za razvoj budućih terapija i sprječavanju karcinogeneze uzrokovane virusima, nego i u boljem razumijevanju interakcija virusnih onkoproteina s proteinima domaćinskih stanica i otkrivanju njihovih novih mehanizama djelovanja i funkcija. Evolucija virusa dovela je do uspješnijeg i efikasnijeg preuzimanja kontrole nad procesima staničnog rasta i diobe, pošto njihova replikacija i preživljenje ovisi o tome. Kao takvi su odlični pokazatelji najbitnijih čimbenika u zamršenoj mreži kontrolnih mehanizama ovih složenih procesa. Dakle, otkrivanjem i proučavanjem preferiranih ciljnih mjesta onkoproteina iz HPV-a i drugih DNA onkovirusa možemo lakše razjasniti njihovu ulogu u zdravoj stanici i kako ometanje njihovih funkcija dovodi do transformacije stanica. Također, velika većina staničnih signalnih puteva i mehanizama koji su narušeni kancerogenezom uzrokovanoj virusima bivaju narušeni i u karcinomima kojima uzrok nisu virusi te su nam saznanja iz ovog područja vrlo bitna za opće razumijevanje procesa kancerogeneze.

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije zasada postoje tri vrste cjepiva za HPV: dvovalentno, kvadrivalentno i nonavalentno te su sva tri vrlo efikasna za sojeve 16 i 18 koji su povezani s najvećim brojem karcinoma uzrokovanih HPV-om. Programi cijepljenja uvedeni su u mnogim zemljama od 2006. godine, a ciljana skupina su mlade adolescentne djevojčice starosti od 9 do 14 godina. Prema podacima za 2014-tu godinu samo je 12% djevojčica navedene skupine sudjelovalo u programima cijepljenja na svjetskoj razini. Većina necijepljenih djevojčica nalazi se u slabije razvijenim zemljama Azije i Afrike gdje je rizik oboljenja od karcinoma vrata maternice ili drugih bolesti uzrokovanih HPV-om vrlo visok (Bruni i sur. 2016). Također, kako zasada ne postoji djelotvorno cjepivo za sve HR sojeve postoji mogućnost da uspješnim suzbijanjem HR sojeva 16, 18, 31, 33, 45, 52 i 58 koji su zastupljeni u nonavalentnom cjepivu dođe do povećanja zastupljenosti ostalih HR sojeva koji nisu pokriveni cjepivima i koji bi onda mogli zaraziti populaciju koju su prije obuhvaćali sojevi zastupljeni u cjepivima. Dakle, iako je cijepljenje najbolja strategija prevencije bolesti uzrokovanih HPV-om procijepljenost je još uvijek mala, pogotovo u zemljama u razvoju. Također, cjepiva su isključivo profilaktička mjera i ne mogu pomoći kada je bolest već nastupila. Zbog toga je i dalje realno očekivati značajan broj novooboljelih u sljedećim godinama, a trenutno ne postoje nikakve ciljanje terapije za maligne bolesti uzrokovane

HPV-om. Osim toga, postoji mogućnost da se među proteinima koji se otkrivaju kao nova ciljna mjesta HPV-a pronađu novi prognostički biomarkeri koji bi značajno ubrzali detekciju bolesti kod zaraženih osoba i time pospješili njihovo liječenje i preživljenje. Na primjer, protein p16 je dobar biomarker za karcinome vrata maternice, ali kod karcinoma glava i vrata dolazi do njegovog povećanja i kod HPV negativnih karcinoma (Keating i sur. 2001; Marur i sur. 2010). Međutim, HPV pozitivni karcinomi glave i vrata imaju manju stopu smrtnosti od HPV negativnih te bi bilo izuzetno značajno predvidjeti nastanak i razvoj bolesti na vrijeme jer bi se preventivnim zahvatima kao što je odstranjivanje tonzila mogao spasiti pacijentov život i pri tome bi se mogli značajno smanjiti troškovi liječenja. Dakle, postoji i dalje velika potreba za istraživanjem mehanizama djelovanja HPV-a i otkrićima koji bi mogli poslužiti kao baza za razvoj učinkovitog lijeka ili novih prognostičkih biomarkera.

5. Zaključci

Zaključci koji se mogu izvesti na temelju ovog diplomskog rada su:

- Onkoproteini E6 iz HR sojeva HPV-a 16, 18 i 33 svojim PDZ vezujućim motivima stvaraju interakcije s proteinom NHERF-2 koji sadrži domene PDZ.
- Posljedica ostvarivanja interakcije onkoproteina E6 s proteinom NHERF-2 je njegova razgradnja uz pomoć staničnog proteasomskog sustava razgradnje proteina.
- Onkoproteini E6 iz LR sojeva HPV-a ne stvaraju interakcije i ne razgrađuju NHERF-2.
- Onkoprotein E6 razgradnjom proteina NHERF-2 stimulira proliferaciju i diobu stanica.

6. Literatura

Accardi R., Rubino R., Scalise M., Gheit T., Shahzad N., Thomas M., Banks L., Indiveri C., Sylla B., Cardone R., Reshkin S., Tommasino M. (2011): E6 and E7 from Human Papillomavirus Type 16 Cooperate To Target the PDZ Protein Na/H Exchange Regulatory Factor 1. *Journal of Virology* **85**(16): 8208-8216.

Ashcroft M., Vousden K. (1999): Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**(53): 7637-7643.

Banks L., Pim D., Thomas M. (2012): Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nature Reviews Cancer* **12**(12): 877-886.

Barrow-Laing L., Chen W., Roman A. (2010): Low- and high-risk human papillomavirus E7 proteins regulate p130 differently. *Virology* **400**(2): 233-239.

Bhattacharya R., Wang E., Dutta S. K., Vohra P. K., E G., Prakash Y. S., Mukhopadhyay D. (2012): NHERF-2 maintains endothelial homeostasis. *Blood* **119**(20): 4798-4806.

Borbely A., Murvai M., Kónya J., Beck Z., Gergely L., Li F., Veress G. (2006): Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression. *Journal of General Virology* **87**(2): 287-294.

Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.

Brehm A., Nielsen S., Miska E., McCance D., Reid J., Bannister A., Kouzarides T. (1999): The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *The EMBO Journal* **18**(9): 2449-2458.

Bruni L., Barrionuevo-Rosas L., Albero G., Serrano B., Mena M., Gómez D., Muñoz J., Bosch F., de Sanjosé S. (2017): Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre), Summary Report 27 July 2017.

Bruni L., Diaz M., Barrionuevo-Rosas L., Herrero R., Bray F., Bosch F., de Sanjosé S., Castellsagué X. (2016): Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *The Lancet Global Health* **4**(7): e453-e463.

Butel J. (2000): Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* **21**(3): 405-426.

D'Abramo C., Archambault J. (2011): Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. *The Open Virology Journal* **5**(1): 80-95.

Dalton-Griffin L., Kellam P. (2009): Infectious causes of cancer and their detection. *Journal of Biology* **8**(7): 67.

DeMasi J., Huh K., Nakatani Y., Munger K., Howley P. (2005): Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(32): 11486-11491.

Dyson N., Howley P., Munger K., Harlow E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**(4893): 934-937.

Filippova M., Song H., Connolly J. L., Dermody T. S., Duerksen-Hughes P. J. (2002): The Human Papillomavirus 16 E6 Protein Binds to Tumor Necrosis Factor (TNF) R1 and Protects Cells from TNF-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **277**(24): 21730-21739.

Gage J. R., Meyers C., Wettstein F. O. (1990): The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *Journal of Virology* **64**(2): 723-730.

Galloway D. A., Laimins L. A. (2015). Human papillomaviruses: shared and distinct pathways for pathogenesis. *Current Opinion in Virology* **14**: 87-92.

Ganti K., Broniarczyk J., Manoubi W., Massimi P., Mittal S., Pim D., Szalmas A., Thatte J., Thomas M., Tomaić V., Banks L. (2015): The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy. *Viruses* **7**(7): 3530-3551.

Gardiol D., Kühne C., Glaunsinger B., Lee S. S., Javier R., Banks L. (1999): Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* **18**(40): 5487-5496.

Hanahan D., Weinberg R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.

Hanahan D., Weinberg R. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**(5): 646-674.

Helt A., Galloway D. A. (2001): Destabilization of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by Human Papillomavirus Type 16 E7 Is Not Sufficient To Overcome Cell Cycle Arrest in Human Keratinocytes. *Journal of Virology* **75**(15): 6737-6747.

Hengstermann A., Linares L. K., Ciechanover A., Whitaker N. J., Scheffner M. (2001): Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(3): 1218-1223.

Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997): Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* **420**(1): 25-27.

Huang S., McCance D. J. (2002): Down Regulation of the Interleukin-8 Promoter by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 through Effects on CREB Binding Protein/p300 and P/CAF. *Journal of Virology* **76**(17): 8710-8721.

Huibregtse J. M., Scheffner M., Howley P. M. (1993): Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and Cellular Biology* **13**(8): 4918-4927.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012): Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100B Human Papillomaviruses. IARC Press: Lyon, France, **100B**: 255-314.

Javier R. T. (2008): Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* **27**(55): 7031-7046.

Jones D., Thompson D., Münger K. (1997): Destabilization of the RB Tumor Suppressor Protein and Stabilization of p53 Contribute to HPV Type 16 E7-Induced Apoptosis. *Virology* **239**(1): 97-107.

Keating J. T., Cviko A., Riethdorf S., Riethdorf L., Quade B. J., Sun D., Duensing S., Sheets E. E., Munger K., Crum C. P. (2001): Ki-67, Cyclin E, and p16 INK4 Are Complimentary Surrogate Biomarkers for Human Papilloma Virus-Related Cervical Neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology* **25**(7): 884-891.

Keller U. B., Old J.B., Dorsey F. C., Nilsson J. A., Nilsson L., MacLean K. H., Chung L., Yang C., Spruck C., Boyd K., Reed S. I., Cleveland J. L. (2007): Myc targets Cks1 to provoke the suppression of p27Kip1, proliferation and lymphomagenesis. *The EMBO Journal* **26**(10): 2562-2574.

Kiyono T., Hiraiwa A., Fujita M., Hayashi Y., Akiyama T., Ishibashi M. (1997): Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(21): 11612-11616.

Klingelhutz A. J., Foster S. A., McDougall J. K. (1996): Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**(6569): 79-82.

Kranjec C., Massimi P., Banks L. (2014): Restoration of MAGI-1 Expression in Human Papillomavirus-Positive Tumor Cells Induces Cell Growth Arrest and Apoptosis. *Journal of Virology* **88**(13): 7155-7169.

Kruger W. A., Yun C. C., Monteith G. R., Poronnik P. (2008): Muscarinic-induced Recruitment of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Involves PSD-95/Dlg/Zo-1-mediated Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **284**(3): 1820-1830.

Langsfeld E., Laimins L. A. (2016): Human Papillomaviruses: Research Priorities for the Next Decade. *Trends in Cancer* **2**(5): 234-240.

Lau A. G., Hall R. A. (2001): Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ Domains: Differential Regulation by Association with Receptor Carboxyl-Termini and by Phosphorylation. *Biochemistry* **40**(29): 8572-8580.

Lee C., Laimins L. A. (2004): Role of the PDZ Domain-Binding Motif of the Oncoprotein E6 in the Pathogenesis of Human Papillomavirus Type 31. *Journal of Virology* **78**(22): 12366-12377.

- Liu Y., Chen J. J., Gao Q., Dalal S., Hong Y., Mansur C. P., Band V., Androphy E. J. (1999): Multiple Functions of Human Papillomavirus Type 16 E6 Contribute to the Immortalization of Mammary Epithelial Cells. *Journal of Virology* **73**(9): 7297-7307.
- Liu Y., Henry G. D., Hegde R. S., Baleja J. D. (2007): Solution Structure of the hDIg/SAP97 PDZ2 Domain and Its Mechanism of Interaction with HPV-18 Papillomavirus E6 Protein. *Biochemistry* **46**(38): 10864-10874.
- Longworth M., Laimins L. A. (2004): The Binding of Histone Deacetylases and the Integrity of Zinc Finger-Like Motifs of the E7 Protein Are Essential for the Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. *Journal of Virology* **78**(7): 3533-3541.
- Mantovani F., Banks L. (2001): The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**(54): 7874-7887.
- Martinez-Zapien D., Ruiz F. X., Poirson J., Mitschler A., Ramirez J., Forster A., Cousido-Siah A., Masson M., Pol S. V., Podjarny A., Travé G., Zanier K. (2016): Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature* **529**(7587): 541-545.
- Marur S., D'Souza G., Westra W. H., Forastiere A. A. (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology* **11**(8): 781-789.
- Moody C. A., Laimins L. A. (2010): Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer* **10**(8): 550-560.
- Nguyen M. L., Nguyen M. M., Lee D., Griep A. E., Lambert P. F. (2003): The PDZ Ligand Domain of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Is Required for E6's Induction of Epithelial Hyperplasia In Vivo. *Journal of Virology* **77**(12): 6957-6964.
- O'Hagan R., Ohh M., David G. (2000): Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes & Development* **14**(17): 2185-2191.
- Pim D., Bergant M., Boon S., Ganti K., Kranjec C., Massimi P., Subbaiah V., Thomas M., Tomaić V., Banks L. (2012): Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting. *The FEBS Journal* **279**(19): 3530-3537.
- Riley R., Duensing S., Brake T., Münger K., Lambert P., Arbeit J. (2003): Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Research* **63**(16): 4862-4871.
- Salehi Z., Niedel J. (1990): Multiple calcium-mediated mechanisms regulate c-myc expression in HL-60 cells. *The Journal of Immunology* **145**(1): 276-282.
- Scheffner M., Huibregtse J., Vierstra R., Howley P. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**(3): 495-505.

Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J., White D., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**(7): 676-682.

Shay J. W., Wright W. E. (2004): Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**(5): 867-874.

Sherr C., Roberts J. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* **13**(12): 1501-1512.

Spangle J., Ghosh-Choudhury N., Munger K. (2012): Activation of Cap-Dependent Translation by Mucosal Human Papillomavirus E6 Proteins Is Dependent on the Integrity of the LXXLL Binding Motif. *Journal of Virology* **86**(14): 7466-7472.

St Guily J., Clavel C., Okais C., Pr etet J., Beby-Defaux A., Agius G., Birembaut P., Jacquard A., L eocmach Y., Soubeyrand B., Riethmuller D., Denis F., Mougin C. (2011): Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head & Neck Oncology* **3**(1): 6.

Thomas M., Banks L. (1999): Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *Journal of General Virology* **80**(6): 1513-1517.

Thomas M., Chiang C. (2005): E6 Oncoprotein Represses p53-Dependent Gene Activation via Inhibition of Protein Acetylation Independently of Inducing p53 Degradation. *Molecular Cell* **17**(2): 251-264.

Thomas M., Massimi P., Navarro C., Borg J., Banks L. (2005): The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene* **24**(41): 6222-6230.

Thomas M., Narayan N., Pim D., Tomai c V., Massimi P., Nagasaka K., Kranjec C., Gammoh N., Banks, L. (2008): Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene* **27**(55): 7018-7030.

Thomas M., Tomai c V., Pim D., Myers M., Tommasino M., Banks L. (2013): Interactions between E6AP and E6 proteins from alpha and beta HPV types. *Virology* **435**(2): 357-362.

Tomai c V., Gardiol D., Massimi P., Ozbun M., Myers M., Banks L. (2009): Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene* **28**(1): 1-8.

Tomai c V. (2016): Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites. *Cancers* **8**(10): 95.

Veldman T., Horikawa I., Barrett J. C., Schlegel R. (2001): Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. *Journal of Virology* **75**(9): 4467-4472.

Veldman T., Liu X., Yuan H., Schlegel R. (2003): Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(14): 8211-8216.

Watson R. A., Thomas M., Banks L., Roberts S. (2003): Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *Journal of Cell Science* **116**(24): 4925-4934.

Westbrook T. F., Nguyen D. X., Thrash B. R., McCance D. J. (2002): E7 Abolishes Raf-Induced Arrest via Mislocalization of p21Cip1. *Molecular and Cellular Biology* **22**(20): 7041-7052.

White E. A., Kramer R. E., Tan M. J. A., Hayes S. D., Harper J. W., Howley P. M. (2012): Comprehensive Analysis of Host Cellular Interactions with Human Papillomavirus E6 Proteins Identifies New E6 Binding Partners and Reflects Viral Diversity. *Journal of Virology* **86**(24): 13174-13186.

Xu M., Luo W., Elzi D. J., Grandori C., Galloway D. A. (2008): NFX1 Interacts with mSin3A/Histone Deacetylase To Repress hTERT Transcription in Keratinocytes. *Molecular and Cellular Biology* **28**(18): 5825-5825.

Yang W., Shen J., Wu M., Arsura M., Fitzgerald M., Suldan Z., Kim D. W., Hofmann C. S., Pianetti S., Romieu-Mourez R., Freedman L. P., Sonenshein G. E. (2001): Repression of transcription of the p27 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**(14): 1688-1702.

Zhang B., Laribee R. N., Klemsz M. J., Roman A. (2004): Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology* **329**(1): 189-198.

Zhang Y., Dasgupta J., Ma R. Z., Banks L., Thomas M., Chen X. S. (2007): Structures of a Human Papillomavirus (HPV) E6 Polypeptide Bound to MAGUK Proteins: Mechanisms of Targeting Tumor Suppressors by a High-Risk HPV Oncoprotein. *Journal of Virology* **81**(7): 3618-3626.

zur Hausen H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* **2**(5): 342-350.

7. Životopis

Rođen sam 6. svibnja 1994. godine u Sydney-u, Australiji. Pohađao sam osnovnu školu Petra Preradovića u Zadru koji sam završio 2009. godine. Upisao sam opći smjer Gimnazije Franje Petrića gdje sam maturirao 2013. godine. Iste godine upisao sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2016. godine sam stekao zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije *cum laude* (s pohvalom) i upisao diplomski studij molekularne biologije na istom fakultetu.

Tijekom studija sudjelovao sam u organizaciji nekoliko znanstvenih skupova: drugog i trećeg simpozija studenata bioloških usmjerenja (SiSB) te europskog simpozija studenata biologije Symbiose 2018. Za organizaciju trećeg SiSB-a sam u akademskoj godini 2017./2018. dobio rektorovu nagradu za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici. Tri puta sam sudjelovao u manifestaciji Noć biologije. U akademskoj godini 2016./2017. odradio sam volontersku stručnu praksu u trajanju od dva mjeseca u Laboratoriju za molekularnu signalizaciju na Institutu za biokemiju II pri Sveučilištu Goethe u Frankfurtu, Njemačkoj. Od 2013. do 2018. godine bio sam stipendist Grada Zadra za deficitarna zvanja. 2015. godine sam kao član hrvatske reprezentacije sudjelovao na europskom prvenstvu u sportu *ultimate frisbee* koje je održano u Copenhagenu, Danskoj. Od početka studija sam član studentske sportske udruge SUBOS.