

# Interakcije proteina p53 s proteinima obitelji p53, NME i GLI

---

**Bradić, Ivan**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:130987>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Ivan Bradić

# **Interakcije proteina p53 s proteinima obitelji p53, NME i GLI**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistra kemije

Zagreb, 2019.



Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Maje Herak Bosnar i neposrednim voditeljstvom Martine Radić, mag. chem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom Otkrivanje novih proteinskih interakcija kao podloga za nove pristupe liječenju melanoma čovjeka - ProNetMel (IP-2013-11-1615).



## Zahvale

*Hvala mentorici dr. sc. Maji Herak Bosnar na prilici da pod njenim mentorstvom izradim diplomski rad. Hvala Vam na svim savjetima i kritikama koje su mi pomogle u izradi ovog rada.*

*Hvala neposrednoj voditeljici Martini Radić, mag. chem. na prenesenom znanju, strpljenju i savjetima pruženim tijekom izrade ovog rada. Također, hvala na svim prijateljskim savjetima i zabavnim trenucima.*

*Hvala doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na kritičkom čitanju diplomskog rada i savjetima.*

*Hvala članovima Laboratorija za proteinsku dinamiku i Laboratorija za nasljedni rak na pomoći i savjetima pruženim tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Hvala svim profesorima na prenesenom znanju.*

*Posebno se zahvaljujem roditeljima i bratu koji su me podržavali kroz cijeli život. Hvala vam što ste uvijek bili uz mene i što ste mi omogućili da slijedim svoje snove.*



# Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>SAŽETAK.....</b>  | <b>IX</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>XI</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Cilj i svrha rada.....</b>                               | <b>2</b>  |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>                            | <b>3</b>  |
| <b>2.1. Obitelj proteina p53 .....</b>                           | <b>3</b>  |
| 2.1.1. Povijest obitelji proteina p53 .....                      | 3         |
| 2.1.2. Struktura i evolucija proteina obitelji p53 .....         | 3         |
| 2.1.3. Izoforme proteina obitelji p53.....                       | 5         |
| 2.1.4. Uloga i karakteristike proteina p53 .....                 | 6         |
| 2.1.5. Uloga i karakteristike proteina p73 .....                 | 9         |
| 2.1.6. Interakcije između izoformi proteina obitelji p53 .....   | 10        |
| <b>2.2. Obitelj proteina GLI.....</b>                            | <b>11</b> |
| <b>2.3. Obitelj proteina NME .....</b>                           | <b>12</b> |
| <b>2.4. Humani melanom.....</b>                                  | <b>13</b> |
| 2.4.1. Karakteristike humanog melanoma .....                     | 13        |
| 2.4.2. Metastatski melanom.....                                  | 14        |
| 2.4.3. Proteini obitelji p53, NME i GLI u humanom melanomu ..... | 15        |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>                            | <b>17</b> |
| <b>3.1. Materijali .....</b>                                     | <b>17</b> |
| 3.1.1. Kemikalije .....  | 17        |
| 3.1.2. Otopine i puferi .....                                    | 17        |
| 3.1.3. Komercijalni kompleti.....                                | 18        |
| 3.1.4. Stanična linija .....                                     | 18        |
| 3.1.5. Bakterijski soj.....                                      | 18        |
| 3.1.6. Hranjive podloge.....                                     | 18        |
| 3.1.7. Protutijela .....   | 19        |
| 3.1.8. Standardi i markeri veličine.....                         | 20        |
| 3.1.9. Ostali materijali.....                                    | 21        |
| 3.1.10. Laboratorijski pribor.....                               | 21        |
| 3.1.11. Uređaji .....  | 21        |
| <b>3.2. Metode rada s bakterijskim kulturama .....</b>           | <b>22</b> |



|   |             |
|---|-------------|
| 3.2.1. Transformacija kemokompetentnih bakterija <i>Escherichia coli</i> .....  | 22          |
| 3.2.2. Umnažanje odabrane transformirane bakterijske kolonije.....  | 22          |
| 3.2.3. Izolacije plazmidne DNA .....  | 23          |
| 3.2.4. Provjera kvalitete izolirane plazmidne DNA elektroforezom u agaroznom gelu.....  | 23          |
| <b>3.3. Metode rada sa staničnim kulturama .....</b>  | <b>24</b>   |
| 3.3.1. Odmrzavanje stanica.....   | 24          |
| 3.3.2. Uzgoj stanica.....   | 24          |
| 3.3.3. Nasađivanje stanica za prolaznu transfekcija plazmidnom DNA .....  | 25          |
| 3.3.4. Prolazna transfekcija stanica plazmidnom DNA .....   | 25          |
| <b>3.4. Priprema proteina za metodu Western blot .....</b>  | <b>27</b>   |
| 3.4.1. Izolacija proteina iz transfeciranih stanica .....   | 27          |
| 3.4.2. Izolacija proteina iz netransfeciranih stanica.....  | 27          |
| 3.4.3. Određivanje ukupne koncentracije izoliranih proteina metodom BCA .....   | 28          |
| 3.4.4. Koimunoprecipitacija izoliranih proteina.....  | 28          |
| <b>3.5. Analiza proteina metodom Western blot .....</b>   | <b>30</b>   |
| 3.5.1. Priprema uzoraka za SDS-PAGE.....  | 30          |
| 3.5.2. Priprema poliakrilamidnog gela i pufera za SDS-PAGE .....  | 30          |
| 3.5.3. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE .....  | 32          |
| 3.5.4. Prijenos razdvojenih proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu.....  | 32          |
| 3.5.5. Bojanje proteina i blokiranje praznina na nitroceluloznoj membrani.....  | 33          |
| 3.5.6. Vizualizacija ciljnih proteina na nitroceluloznoj membrani.....  | 33          |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>35</b>   |
| <b>4.1. Provjera umnoženih plazmidnih DNA.....</b>  | <b>35</b>   |
| <b>4.2. Ispitivanje interakcija proteina p53 s proteinima obitelji p53, NME i GLI.....</b>  | <b>36</b>   |
| 4.2.1. Ispitivanje interakcija izoforme p53 $\alpha$ s izoformama $\Delta$ 133p53 $\alpha$ i $\Delta$ 133p53 $\beta$ .....                              | 37          |
| 4.2.2. Ispitivanje interakcija izoforme p53 $\alpha$ s izoformama TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$ , $\Delta$ Np73 $\alpha$ i $\Delta$ Np73 $\beta$ ..... | 38          |
| 4.2.3. Ispitivanje interakcija izoforme p53 $\alpha$ s proteinima GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL.....  | 41          |
| 4.2.4. Ispitivanje interakcija izoforme p53 $\alpha$ s proteinima NME1 i NME2.....  | 42          |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>44</b>   |
| <b>§ 6. LITERATURNI IZVORI.....</b>   | <b>45</b>   |
| <b>§ 7. ŽIVOTOPIS .....</b>   | <b>XIII</b> |



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

Interakcije proteina p53 s proteinima obitelji p53, NME i GLI

Ivan Bradić

Protein p53 transkripcijski je faktor koji regulacijom ekspresije mnogo različitih gena sudjeluje u supresiji tumora. Mutacije gena p53 uočene su u više od 50 % tumora. Pokazano je da se mutirani protein p53 ponaša kao onkogen. U melanomu rijetko dolazi do mutacije gena p53, no uočeno je kako je tumor supresorska funkcija proteina p53 svejedno narušena. Pokazano je da određeni proteini obitelji p53, NME i GLI sudjeluju u razvoju melanoma. Naša je pretpostavka da mehanizmu inaktivacije divljeg tipa proteina p53 u melanomima pridonose određene proteinske interakcije. Zbog toga smo proveli ispitivanje mogućih interakcija između proteina p53 i proteina obitelji p53, NME i GLI. Dobiveni rezultati pokazali su da protein p53 stupa u interakciju s izoformama del133p53alfa, TAp73alfa, Tap73beta i delNp73alfa. Ovi rezultati dobiveni na egzogenim proteinima mogu ukazati na to koje se interakcije mogu očekivati na endogenim proteinima i koji bi proteini mogli poslužiti kao moguće mete u liječenju melanoma.

(47 stranica, 9 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: melanom, proteinske interakcije, p53, p73, NME, GLI

Mentor: dr.sc. Maja Herak Bosnar, znanstvena savjetnica

Neposredni voditelj: Martina Radić, mag. chem.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec.

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
  2. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  3. doc. dr. sc. Ivica Đilović
- Zamjena: prof. dr. sc. Ita Gruić Sovulj

Datum diplomskog ispita: 18. rujna 2019.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Interactions between p53 and p53, NME and GLI protein family  
members

Ivan Bradić

p53 protein is a transcription factor that suppresses tumour formation through regulation of expression of many different genes. p53 gene is mutated in more than 50 % of all tumours. It has been shown that mutations transform its tumour suppressor nature to an oncogenic one. p53 is rarely mutated in melanoma, however, its tumour suppressor activity in these tumours is still impaired. It has been shown that specific members of p53, NME and GLI protein family take part in melanoma formation. Therefore, we hypothesised that the p53 activity in melanoma could be impaired by interactions with certain proteins. Based on that, we have tested if p53 interacts with p53, NME and GLI protein family members. The obtained results show that p53 interacts with del133p53alfa, TAp73alfa, Tap73beta and delNp73alfa isoforms. These results, obtained with exogenous proteins, might be an indication of possible interactions with endogenous proteins and point out possible targets in treating melanoma.

(47 pages, 9 figures, 4 tables, 45 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: melanoma, protein interactions, p53, p73, NME, GLI

Mentor: Dr. Maja Herak Bosnar, Senior Scientist

Assistant mentor: Martina Radić, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor

2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Full Professor

3. Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor

Substitute: Dr. Ita Gruić Sovulj, Full Professor

Date of exam: 18<sup>th</sup> September 2019.



## § 1. UVOD

Protein p53 otkriven je 1979. godine prilikom istraživanja tumora izazvanih simian virusom 40 (SV40) kao protein koji stupa u interakciju s velikim T antigenom SV40. Primarno djeluje kao transkripcijski faktor koji se aktivira u raznim okolnostima i stimulira transkripciju cijelog niza gena<sup>1</sup>. Budući da je mutiran u više od 50 % tumora, smatra se izrazito važnim tumorskim supresorom. Ovisno o okolnostima u kojima se aktivira, protein p53 stimulira privremeni zastoj staničnog ciklusa, trajni zastoj staničnog ciklusa ili apoptozu te tako onemogućuje nastanak tumora. Osim što sudjeluje u inicijaciji navedenih procesa, danas je poznato da u određenim okolnostima inhibira glikolizu, stimulira autofagiju, inhibira angiogenezu te je uključen u razne druge stanične procese<sup>2</sup>.

Protein p53 član je obitelji proteina p53 koju uz njega čine proteini p63 i p73. Mutacije u genima za p63 i p73, *TP63* i *TP73*, u tumorima puno su rjeđe u usporedbi s mutacijama u genu za p53, *TP53*, te njihova funkcija u tumorogenezi nije u potpunosti razjašnjena. Svaki navedeni gen sadrži više promotora i više mjesta alternativnog prekrajanja te stoga kodira više izoformi. Ekspresijski profil izoformi proteina obitelji p53 u normalnim stanicama razlikuje se od ekspresijskog profila u tumorskim stanicama, stoga je zaključeno da promjena u ekspresiji određenih izoformi proteina obitelji p53 može pogodovati tumorogenezi. Onkogeno djelovanje takvih izoformi primarno se očituje kroz njihove međusobne interakcije, a za određene prekomjerno eksprimirane izoforme uočeno je da inhibiraju tumor supresorsku aktivnost proteina p53, odnosno da imaju dominantno-negativan utjecaj na njegovu aktivnost<sup>3</sup>.

U melanomima rijetko dolazi do mutacija gena *TP53*, no unatoč tome, dokazano je kako u gotovo 90 % slučajeva protein p53 ne obavlja funkciju tumorskog supresora. Kako su melanociti manje skloni apoptozi induciranoj uz pomoć p53, smatra se da mutacija gena *TP53* često nije potrebna za nastanak melanoma. No, aktivnost proteina p53 svejedno se mora utišati da bi melanom mogao nesmetano rasti i metastazirati<sup>4</sup>. S obzirom na to da je dokazano da interakcije određenih izoformi proteina obitelji p53 s proteinom p53 mogu narušiti njegovu funkciju<sup>3</sup>, moguće je da je aktivnost p53 u melanomima inhibirana na sličan način, odnosno kroz interakcije proteina p53 s drugim proteinima. Kako su pokazane direktne interakcije proteina p53 s članovima obitelji proteina NME (engl. *nonmetastatic clone 23*)<sup>5</sup> te indirektne interakcije s članovima obitelji proteina GLI (engl. *glioma-associated oncogene*)<sup>6</sup>, a za obje

obitelji pokazano je da imaju ulogu u razvoju melanoma, moguće je da na aktivnost proteina p53 u melanomu utječu interakcije s proteinima iz navedenih proteinskih obitelji<sup>7-9</sup>

### 1.1. Cilj i svrha rada

Poznato je da je mutacija gena *TP53* česta pojava u većini tumora, ali ne i u melanomima. Unatoč navedenom, protein p53 ne obavlja funkciju tumorskog supresora u gotovo 90 % melanoma<sup>2,4</sup>. Stoga pretpostavljamo da mehanizmu inaktivacije divljeg tipa proteina p53 u melanomima pridonose određene proteinske interakcije. Nastavno na navedeno, cilj rada bio je ispitati interakcije proteina p53 s proteinima koji bi potencijalno mogli doprinijeti inaktivaciji proteina p53 u melanomima. Kako je poznato da proteini obitelji p53, NME i GLI imaju ulogu u razvoju melanoma<sup>7-9</sup>, proteini iz navedenih obitelji odabrani su za ispitivanje interakcija s proteinom p53. U cilju ispitivanja mogućih proteinskih interakcija, nakon prekomjerne ekspresije potencijalnih proteinskih partnera prolaznom transfekcijom stanica u kulturi melanoma proveli smo eksperiment koimunoprecipitacije. Jedan od potencijalnih partnera bio je obilježen privjeskom FLAG pomoću kojega se iz staničnog lizata izdvojio obilježeni protein i njegovi proteinski partneri. Nadalje, jedan od potencijalnih partnera uvijek je bio protein p53, a drugi potencijalni partner bio je jedan od proteina iz obitelji p53, NME ili GLI. Rezultati dobiveni na egzogenim proteinima pokazali su koje se interakcije mogu očekivati na endogenim proteinima. Svrha rada sastoji se u pronalasku potencijalnih partnera proteina p53 koji bi mogli poslužiti kao moguće mete u liječenju melanoma.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Obitelj proteina p53

#### 2.1.1. Povijest obitelji proteina p53

Protein p53, prvi član obitelji p53, otkriven je 1979. godine kao protein koji stvara kompleks s velikim T antigenom SV40 iz seruma mišjih stanica inficiranih SV40<sup>10</sup>. SV40 ubrajamo u polioviruse, koji ekspimiraju mali i veliki, a ponekad i srednji T antigen u inficiranim stanicama. Smatralo se da SV40 ne kodira srednji T antigen, ali se i dalje nastojao pronaći u stanicama inficiranim SV40<sup>11</sup>. Prilikom tog pothvata, imunoprecipitacijom velikog T antigena SV40 uočen je novi protein mase 53 kDa, no svojstva novootkrivenog proteina ukazivala su da se ne radi o proteinu koji je kodiran genomom SV40, već da je novootkriveni protein staničnog podrijetla<sup>10</sup>. Novootkriveni protein nazvan je p53 jer mu je prilikom razdvajanja diskontinuiranom poliakrilamidnom elektroforezom u prisustvu natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) određena molarna masa od oko 53 kDa, iako je kasnije utvrđeno da mu je stvarna molarna masa 43,7 kDa. U isto vrijeme, još je nekoliko grupa neovisno otkrilo isti protein<sup>1</sup>. Daljnjim istraživanjima uočeno je da p53 stvara komplekse s raznim virusnim onkogenim proteinima, da njegova ekspresija ovisi o fazi staničnog ciklusa te da prilikom izlaganja stanica ultraljubičastom (UV, engl. *ultraviolet*) zračenju ili kancerogenima dolazi do povećanja njegove koncentracije. Uzimajući navedeno u obzir, zaključilo se da je protein p53 važna komponenta u regulaciji staničnog ciklusa i sintezi DNA te da bi zbog svoje sposobnosti zaustavljanja staničnog ciklusa mogao imati važnu ulogu u supresiji tumora<sup>12</sup>. Deset godina nakon njegova otkrića, otkrilo se da je gen *TP53* mutiran u većini ljudskih tumora te se shvatila njegova važnost u tumorogenezi<sup>13</sup>.

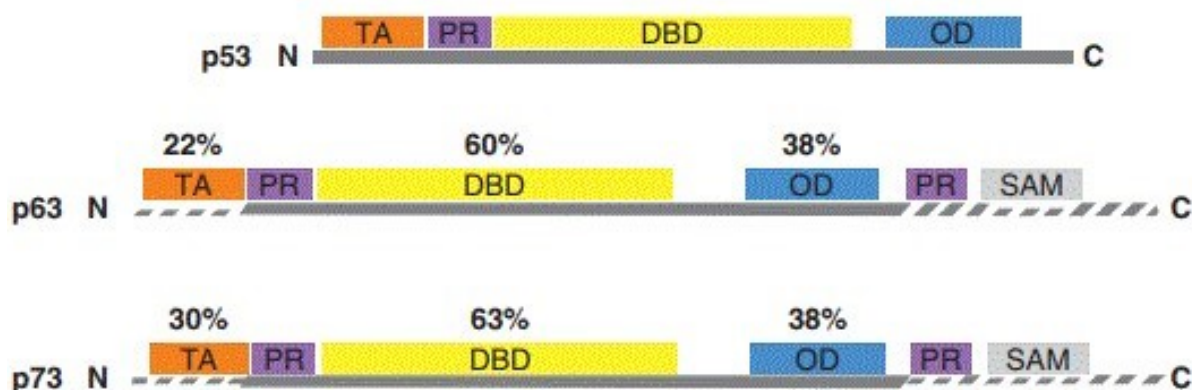
1997. godine otkriven je prvi homolog proteina p53, protein p73, a godinu dana kasnije drugi, protein p63. Za oba je pokazano da stvaraju komplekse s proteinom p53 te da zbog svoje strukture sličnosti s p53 dijelom sudjeluju u sličnim procesima<sup>14</sup>.

#### 2.1.2. Struktura i evolucija proteina obitelji p53

Proteini p53, p63 i p73 slične su strukture i funkcije. Posjeduju tri domene velike sličnosti, transaktivacijsku domenu (TA, engl. *transactivation domain*), domenu za vezanje DNA (DBD,



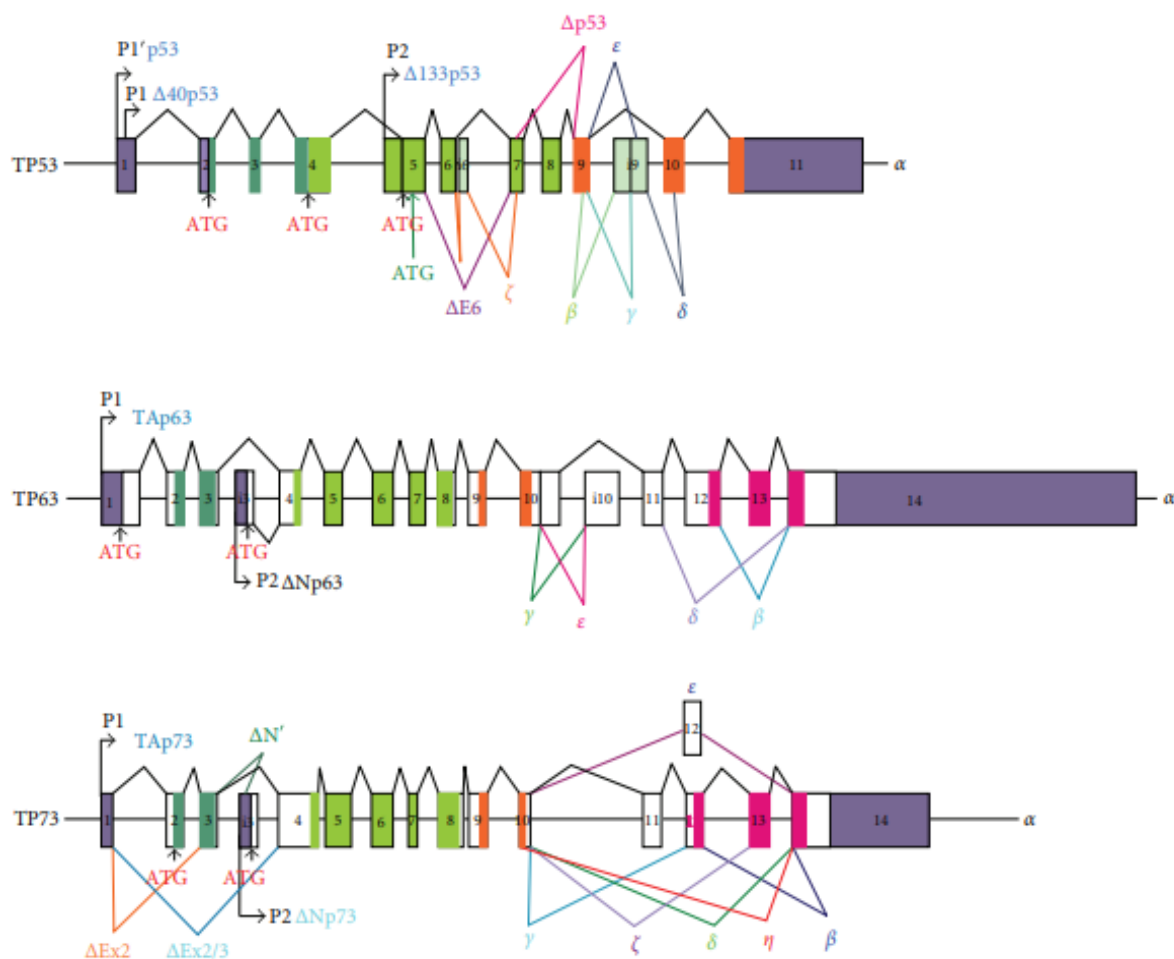
engl. *DNA binding domain*) i oligomerizacijsku domenu (OD, engl. *oligomerisation domain*)<sup>3</sup>. Najviši stupanj sličnosti uočen je između DBD, pri čemu su položaji aminokiselina s kojima protein p53 ostvaruje interakciju s DNA u potpunosti očuvani u proteinima p63 i p73<sup>14</sup>. Zanimljivo je da je sličnost između proteina p63 i p73 veća nego njihova sličnost s proteinom p53<sup>15</sup>. Analizom homologa proteina p53 u raznim jednostavnijim organizmima poput *Caenorhabditis elegans*, zaključeno je da je prvotna uloga proteina obitelji p53 bila održavanje genetičke stabilnosti spolnih stanica. Nadalje, kako je otkriveno da protein p63 sudjeluje u održavanju genetičke stabilnosti ljudske jajne stanice, smatra se da je predak proteina p63 zajednički predak cijele obitelji p53 koja obuhvaća i p63 i p53 i p73. Na temelju filogenetskih studija zaključeno je da se p73 u evolucijskoj povijesti pojavio nakon p63, dok se p53 pojavio posljednji<sup>14</sup>. Osim navedene tri domene, proteini obitelji p53 dijele i druge strukture elemente. Između DBD i OD svih proteina obitelji p53 nalazi se slijed od nekoliko aminokiselina koji služi kao lokalizacijski signal za jezgru (NLS, engl. *nuclear localisation signal*), dok se između TA i DBD nalazi regija bogata prolinom (PR, engl. *proline rich region*). Razlike u proteinskim strukturama ipak postoje te su najistaknutije na karboksi (C)-kraju proteina. Protein p53 na C-kraju sadrži bazičnu domenu, dok proteini p63 i p73 sadrže sterilni  $\alpha$ -motiv (SAM, engl. *sterile alpha motif*) i iza njega inhibicijsku domenu (ID, engl. *inhibitory domain*)<sup>16</sup>. S druge strane, na amino (N)-kraju proteina p53, TA je podijeljena na TA1 i TA2<sup>17</sup>. Osnovna strukturna organizacija proteina p53, p63 i p73 te razina sličnosti između pojedinih domena proteina p53 s domenama proteina p63 i p73 prikazana je na slici 1.



Slika 1. Strukturna organizacija proteina p53, p63 i p73 te razina sličnosti između pojedinih domena proteina p53 s domenama proteina p63 i p73. Sva tri proteina posjeduju transaktivacijsku domenu (TA, označena narančastom bojom), regiju bogatu prolinom (PR, označena ljubičastom bojom), domenu za vezanje na DNA (DBD, označena žutom bojom), oligomerizacijsku domenu (OD, označena plavom bojom). Domena sterilnog  $\alpha$ -motiva (SAM), prikazana sivom bojom prisutna je samo u proteinima p63 i p73<sup>14</sup>.

### 2.1.3. Izoforme proteina obitelji p53

Proteini obitelji p53 u stanicama su prisutni u više izoformi<sup>3</sup>, što je dokazano i sekvenciranjem humanog genoma<sup>17</sup>. Gen *TP53* nalazi se na kromosomu 17, gen *TP63* na kromosomu 3, a gen *TP73* na kromosomu 1. Geni *TP63* i *TP73* duljine su oko 65 kb, dok gen *TP53* ima 20 kb<sup>15</sup>. Raznolik sadržaj izoformi proteina p53, p63 i p73 posljedica je mogućnosti inicijacije transkripcije s dva različita promotora i alternativnog prekrajanja mRNA na 3' i 5' krajevima<sup>3</sup>. Izoforme proteina p63 i p73 nastale ekspresijom s prvog promotora (P1) označavaju se kao TAp63 i TAp73, dok se izoforme nastale ekspresijom s drugog promotora (P2) označavaju kao  $\Delta$ Np63 i  $\Delta$ Np73. S druge strane, izoforma proteina p53 nastala ekspresijom s P1 označava se kao p53, a izoforma nastala ekspresijom s P2 kao  $\Delta$ Np53<sup>14</sup>.  $\Delta$ N izoforme proteina p53 i p73 također mogu nastati ekspresijom s P1 zahvaljujući alternativnom prekrajanju na 5'-kraju mRNA. Spektar izoformi dodatno proširuje alternativno prekrajanje mRNA na 3'-kraju, a ovisno o kombinaciji eksona, izoforme se označavaju različitim grčkim slovima ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) iza imena proteina<sup>16</sup>. Procjenjuje se da u teoriji postoji oko 20 izoformi proteina p53, oko 10 izoformi proteina p63 te više od 40 izoformi proteina p73<sup>3</sup>. No, samo je dio izoformi zaista i potvrđen u stanicama<sup>15</sup>. Struktura gena *TP53*, *TP63* i *TP73* te organizacija eksona u pojedinim izoformama prikazana je na slici 2.



Slika 2. Struktura gena *TP53*, *TP63* i *TP73*. Eksoni su označeni brojevima unutar kvadratića.

Označeni su različitim bojama: zelenom bojom prikazani su eksoni koji kodiraju TA, svijetlozelenom bojom eksoni koji kodiraju DBD, narančastom bojom eksoni koji kodiraju OD, ružičastom bojom eksoni koji kodiraju SAM, ljubičastom bojom označeni su nekodirajući eksoni, a bijelom su označeni eksoni koji kodiraju određeni dio proteina koji ne pripada ni u jednu od navedenih domena. P1, P1' i P2 označavaju promotore. Alternativno prekrajanje prikazano je s dvije linije koje povezuju dva eksona, a oznaka koju nosi izoforma nastala takvim prekrajanjem nalazi se na ishodištu linija<sup>3</sup>.

#### 2.1.4. Uloga i karakteristike proteina p53

Tumorski supresor p53 svoje funkcije primarno izvršava kroz regulaciju transkripcije mnoštva različitih gena<sup>1</sup>. Sadrži dvije domene kojima se može vezati na DNA, bazičnu domenu koja služi za nespecifično vezanje i DBD koja prepoznaje i veže specifični konsenzusni slijed DNA. Biofizičkim metodama određeno je da protein p53 ciljnu sekvencu vjerojatno prepoznaje

kombinacijom brze nespecifične difuzije bazične domene po DNA i specifičnog vezanja DBD, a za to je potrebna brza konformacijska promjena iz jednog stanja u drugo<sup>18</sup>. Protein p53 se na DNA veže u obliku tetramera, a za njegovu oligomerizaciju važna je OD. Nakon što se protein p53 veže na ciljnu sekvencu, on reagira s različitim transkripcijskim faktorima putem svoje TA i potiče transkripciju ciljnih gena<sup>19</sup>. Pretragom ljudskog genoma s konsenzusnim slijedom na koji se veže protein p53, pronašao se veliki broj raznih gena uključenih u razne stanične procese<sup>1</sup>. Funkcija proteina p53 primarno se očituje kroz transkripcijsku regulaciju, a to potvrđuje podatak da je u tumorima p53 najčešće mutiran u DBD koja je važna da bi p53 prepoznao konsenzusni slijed i potaknuo ekspresiju ciljnih gena.

Do aktivacije proteina p53 dolazi u različitim uvjetima, kao što su hipoksija, oštećenje DNA, nedostatak nutrijenata te ekspresija onkogena. Ovisno o stresnim okolnostima kojima je stanica izložena, protein p53 može inducirati različite stanične odgovore. Kada je stanica izložena niskim razinama stresa, protein p53 inducira privremeni zastoj staničnog ciklusa, ekspresiju antioksidansa i popravak DNA. S druge strane, ako je razina stresa prevelika i oštećenja u stanici se ne mogu popraviti, protein p53 inducira trajni zastoj staničnog ciklusa, senescenciju ili apoptozu<sup>2</sup>. Zbog kompleksnosti uloge proteina p53 te raznih direktnih i indirektnih interakcija u koje stupa s mnoštvom proteina, još uvijek nije utvrđen točan mehanizam s kojim p53 odlučuje treba li potaknuti apoptozu ili privremeni zastoj staničnog ciklusa<sup>20</sup>. Smatra se da je inicijacija ekspresije proteina p21 ključno svojstvo proteina p53 u regulaciji staničnog ciklusa. Protein p21 inhibitor je kinaza ovisnih o ciklinu te stoga inhibira rast stanice i staničnu diobu. S druge strane, protein p53 apoptozu može potaknuti transkripcijskom aktivacijom gena obitelji Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)<sup>12</sup>, ali i direktnom interakcijom s proteinima obitelji Bcl-2<sup>1</sup>. Dokazano je da divlji tip proteina p53 u normalnim stanicama sudjeluje i u regulaciji metabolizma stimulirajući oksidacijsku fosforilaciju i inhibirajući glikolizu, dok mutant proteina p53 u tumorskim stanicama stimulira glikolizu čak i uz prisutnost kisika. Pojava da stanica u aerobnim uvjetima dobiva energiju primarno iz glikolize, a ne puno efikasnijim putem oksidacijske fosforilacije, naziva se Warburgovim efektom i karakteristična je za tumorske stanice. Osim u metabolizmu šećera, dokazano je da protein p53 sudjeluje u regulaciji metabolizma lipida<sup>21</sup> te da sudjeluje u inhibiciji angiogeneze inicijacijom ekspresije trombospodina-1 te tako inhibira rast tumora<sup>12</sup>.

Kako bi protein p53 potaknuo potreban stanični odgovor njegova aktivnost strogo je regulirana primarno kroz interakciju njegove TA s E3 ubikvitinskom ligazom MDM2 (engl.

*mouse double minute 2 homolog*)<sup>1</sup>. Smatra se da se protein p53 aktivira kroz razne post-translacijske modifikacije. Također, uočeno je kako i post-translacijske modifikacije proteina MDM2 utječu na aktivaciju p53. Pokazano je da modifikacije proteina p53 i MDM2 narušavaju njihovu interakciju i tako omogućuju stabilizaciju i aktivaciju proteina p53. Protein MDM2 posjeduje svojstvo samoubikvitinacije koje je u normalnim uvjetima inhibirano interakcijom s proteinom HAUSP (engl. *herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*), dok u stresnim uvjetima dolazi do narušavanja te interakcije te se MDM2 počne ubikvitinirati i razgrađivati. Za aktivaciju proteina p53 bitan je i tumor supresorski protein ARF (engl. *alternative reading frame*) koji u uvjetima ekspresije onkogeno veže MDM2 te tako onemogućuje njegovo vezanje za protein p53. Osim proteina ARF, vezanje proteina MDM2 na p53 u stresnim uvjetima onemogućuje i fosforilacija proteina p53 serinskom kinazom ATK<sup>20</sup>. Također, zanimljivo je kako protein p53 stimulira ekspresiju proteina MDM2 te tako može inhibirati vlastitu funkciju. Nadalje, uočeno je kako je aktivnost proteina p53 regulirana i interakcijom s proteinom MDMX. Protein MDMX je homolog MDM2, ali ne posjeduje aktivnost ubikvitinske ligaze. Važnost ovih proteina u regulaciji aktivnosti p53 najbolje je pokazana ranom smrću MDMX *knock-out* (-/-) ili MDM2<sup>-/-</sup> miševa<sup>1,20</sup>.

Otkriće da gen *TP53* kodira razne izoforme proteina p53 dodatno je zakompliciralo tumačenje uloge proteina p53 u regulaciji prethodno navedenih staničnih procesa i u supresiji tumora. Poznato je da se ekspresijski profili izoformi proteina p53 razlikuju ovisno o vrsti stanice te između normalnih i tumorskih stanica<sup>17</sup>. Omjer izoformi proteina p53 važan je za ispravno funkcioniranje p53<sup>22</sup>. Kako protein p53 prilikom vezanja za DNA i transkripcijske aktivacije stvara tetramere, smatra se da izoforme proteina p53 utječu na njegovu aktivnost upravo stvaranjem heterotetramera s izoformom p53 $\alpha$ . Ovisno o tome koje se izoforme nalaze u kompleksu, protein p53 će imati različitu aktivnost. Nadalje, ako je omjer izoformi proteina p53 bitan za ispravnu regulaciju staničnih procesa posredovanih proteinom p53, onda i mutacije u nekodirajućoj regiji gena *TP53* mogu potaknuti nastanak tumora jer utječu na brzinu ekspresije<sup>17</sup>. Poznato je da  $\Delta 40p53\alpha$ , izoforma proteina p53 kojoj nedostaje TA1, može povećati aktivnost proteina p53 te potaknuti ekspresiju gena nedostupnih izoformi p53 $\alpha$ <sup>22</sup>. S druge strane,  $\Delta 133p53\alpha$ , izoforma proteina p53 kojoj nedostaje cijela TA, cijela PR i dio DBD, smatra se onkogenom jer se povezuje s inicijacijom angiogeneze i u većim koncentracijama može smanjiti mogućnost proteina p53 da inicira apoptozu<sup>3,22</sup>. Za nedavno otkrivenu izoformu  $\Delta 160p53\alpha$  kojoj nedostaje cijela TA, cijela PR i veći dio DBD, uočilo se da ima ulogu u gubitku

tumor supresorske funkcije mutanta proteina p53<sup>22</sup>. Osim navedenih izoformi  $\alpha$  uočene su i sljedeće: p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 160p53 $\beta$  i  $\Delta$ 160p53 $\gamma$ <sup>23</sup>. Također, u nekim tumorima jajnika uočene su izoforme p53 $\delta$ , p53 $\epsilon$  i p53 $\zeta$ <sup>16</sup>.  $\beta$  i  $\gamma$  izoforme proteina p53 zbog alternativnog prekrajanja na C-kraju nemaju klasičnu OD. Naime, prethodno je spomenuto da je OD važna kako bi protein p53 mogao stvarati tetramere, no uočeno je da je važna i za interakciju proteina p53 s drugim proteinima koji nisu iz obitelji p53 te se stoga može zaključiti da će funkcija  $\beta$  i  $\gamma$  izoformi biti dijelom drugačija od funkcije  $\alpha$  izoformi<sup>23</sup>.

#### 2.1.5. Uloga i karakteristike proteina p73

Proteini p63 i p73 posjeduju visoku razinu strukturne sličnosti s proteinom p53 te potiču transkripciju mnogo gena za koje je dokazano da su meta p53. Svi proteini obitelji p53 sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa i inicijaciji apoptoze<sup>24</sup>. Također, uočeno je da proteini p63 i p73 mogu inicirati apoptozu neovisno o p53<sup>15</sup>. p73 je važan u razvoju centralnog živčanog sustava (CNS, engl. *central nervous system*)<sup>15,25</sup>, a miševske s inaktivnim p73 karakteriziraju poremećaji u ponašanju te rana smrt uzrokovana kroničnim infekcijama i upalnim procesima<sup>24</sup>.

Kao i protein p53, proteini p63 i p73 podliježu mnogobrojnim post-translacijskim modifikacijama te stvaraju mnogobrojne interakcije s velikim brojem proteina<sup>24,26</sup>. p63 i p73, kao i protein p53, stvaraju tetramere, a omjer njihovih izoformi smatra se bitnim za njihovu aktivnost. Izoforme TAp63 $\gamma$  i TAp73 $\gamma$  po svojoj su strukturi najbližnje p53 $\alpha$ . Prekomjerno eksprimirana izoforma TAp63 $\gamma$  ima istu transkripcijsku aktivnost i mogućnost inicijacije apoptoze kao i p53 $\alpha$ . S druge strane, transkripcijski najaktivnija izoforma proteina p73 je TAp73 $\beta$ . Najmanje transkripcijski aktivne izoforme proteina p63 i p73 su TAp63 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$ , a za njihovu malu aktivnost odgovorna je ID. Naime, smatra se da ID smanjuje transkripcijsku aktivnost izoformi TAp63 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$  kroz intermolekulske ili intramolekulske interakcije s TA navedenih izoformi, ali i kroz razne druge proteinske interakcije<sup>25</sup>. Najbolje su istražene funkcije TA i  $\Delta$ N izoformi, dok su izoforme nastale alternativnim prekrajanjem na 3'-kraju mRNA slabije istražene<sup>6</sup>. Dosadašnja istraživanja izoformi proteina p73 pokazala su da je izoforma TAp73 bitna u supresiji tumora i kontroli diferencijacije, dok je za izoformu  $\Delta$ Np73 utvrđeno da inhibira apoptozu te da je važna u razvoju CNS<sup>24</sup>.

Regulacija aktivnosti proteina p63 i p73 temelji se na raznim post-translacijskim modifikacijama te na interakcijama s drugim proteinima. Za proteine p63 i p73 pokazano je da stupaju u interakciju s proteinom MDM2, no njihova interakcija s MDM2 ne rezultira njihovom

razgradnjom. Naime, vezanjem proteina MDM2 na protein p73 inhibira se transkripcijska aktivnost p73<sup>26</sup>, dok ishod interakcije proteina MDM2 s proteinom p63 nije u potpunosti razjašnjen<sup>24</sup>. Uloge proteina koji sudjeluju u regulaciji aktivnosti p63 i p73 nisu u potpunosti razjašnjene<sup>26</sup>. E3 ubikvitinska ligaza ITCH služi kao primarni regulator aktivnost proteina p63 i p73, no ne regulira aktivnost proteina p53. Njena uloga je vezanje i ubikvitinacija proteina p63 i p73 te stimuliranje njihove razgradnje. U slučaju oštećenja DNA, uočeno je da dolazi do razgradnje E3 ubikvitinske ligaze ITCH te se stoga povećava razina proteina p63 i p73<sup>24,27,28</sup>.

#### 2.1.6. Interakcije između izoformi proteina obitelji p53

Smatra se da je ekspresijski profil izoformi proteina obitelji p53, kao i njihove međusobne interakcije, važan u regulaciji raznih staničnih procesa, a tako i u tumorogenezi<sup>16</sup>. Za izoforme proteina p53, p63 i p73 karakteristično je da putem svoje OD stvaraju heterotetramere kojima se vežu na DNA, pri čemu izoforme proteina p63 i p73 mogu međusobno formirati heterotetramere, dok heterotetrameri nastali od izoformi proteina p53 rijetko sadrže izoforme proteina p63 i p73<sup>26</sup>. *Saccharomyces cerevisiae* je pogodan sustav za proučavanje funkcije proteina obitelji p53 jer njegov genom ne kodira homologe obitelji p53. Istraživanja obitelji p53 provedena na *S. cerevisiae* pokazala su da su izoforme p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  jedine transkripcijski aktivne izoforme proteina p53, a dominantno-negativni utjecaj na transkripcijsku aktivnost izoforme p53 $\alpha$  pokazale su samo izoforme  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 160p53 $\alpha$ . Uvođenjem mutacije koja narušava mogućnost tetramerizacije izoformi  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 160p53 $\alpha$  uočilo se da izoforme više ne inhibiraju transkripcijsku aktivnost izoforme p53 $\alpha$  te se zaključilo da je izoforma p53 $\alpha$  inhibirana samo izoformama proteina p53 koje nisu transkripcijski aktivne i mogu stvarati tetramere. Također, uočeno je da mutanti izoforme p53 $\alpha$  na isti način inhibiraju transkripcijsku aktivnost izoforme p53 $\alpha$ . S druge strane, sve izoforme proteina p63 i p73 pokazale su transkripcijsku aktivnost, osim izoformi  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  čija je transkripcijska aktivnost neznatna. Za izoforme  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  dokazano je da djeluju dominantno-negativno na izoforme p63 i p73 s TA, ali i na izoformu p53 $\alpha$ <sup>29</sup>. Izoforma  $\Delta$ Np73 $\alpha$  inhibira transkripcijsku aktivnost izoforme TAp73 $\alpha$  formiranjem heterotetramera ili kompetitivnim vezanjem na sljedove DNA koje prepoznaje izoforma TAp73 $\alpha$ , dok transkripcijsku aktivnost izoforme p53 $\alpha$  inhibira vjerojatno samo kroz kompetitivno vezanje na sljedove DNA koje prepoznaje izoforma p53 $\alpha$ <sup>24</sup>. Nadalje, uočeno je da različiti mutanti proteina p53 mogu ostvarivati različite interakcije s izoformama proteina obitelji p53<sup>15,28</sup>.

## 2.2. Obitelj proteina GLI

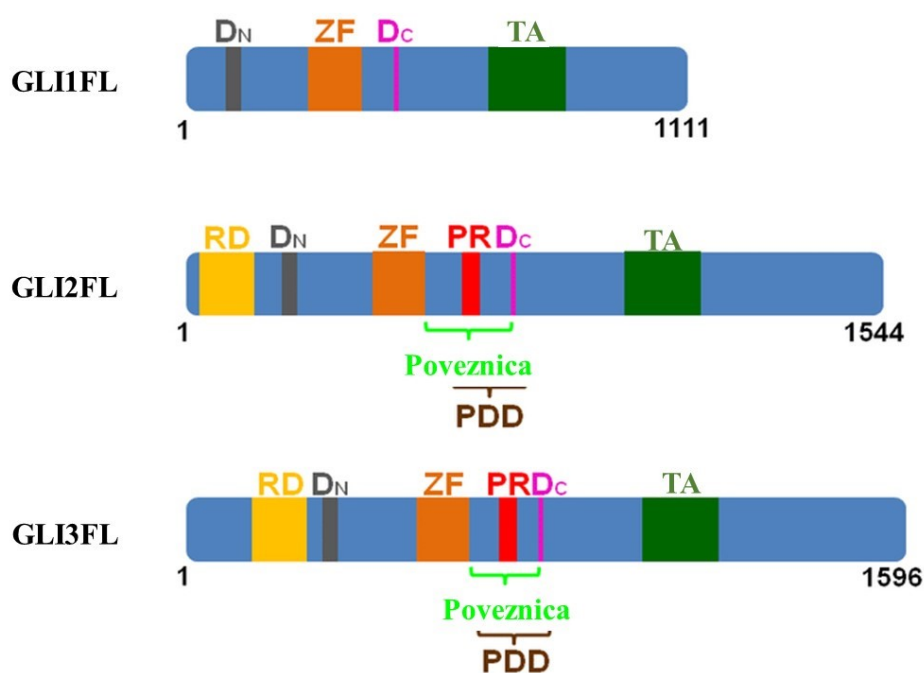
Proteini obitelji GLI transkripcijski su faktori koji sudjeluju u prijenosu signala u signalnom putu Hedgehog (HH)<sup>30</sup>. Kod sisavaca su pronađena tri proteina iz obitelji GLI, GLI1, GLI2 i GLI3, a njihova struktura prikazana je na slici 3. Proteini GLI2 i GLI3 sadrže represorsku domenu (RD, engl. *repressor domain*) i TA te stoga mogu djelovati kao transkripcijski aktivatori ili transkripcijski represori. S druge strane, protein GLI1 djeluje isključivo kao transkripcijski aktivator jer sadrži samo TA. Proteini GLI2 i GLI3 sadrže domenu za procesiranje (PDD, engl. *processing determinant domain*) koja uključuje dio motiva cinkovih prstiju (ZF, engl. *zinc finger motif*), poveznicu (engl. *linker*), područje procesiranja (PR, engl. *processing region*) i C-terminalnu domenu degron (D<sub>C</sub>) te se stoga proteolitički procesiraju u kraće verzije. S druge strane, protein GLI1 ne sadrži cijelu PDD te stoga ne podliježe proteolitičkom procesiranju, već se u potpunosti razgrađuje kada je to potrebno. Osim D<sub>C</sub>, proteini obitelji GLI sadrže i N-terminalnu domenu degron (D<sub>N</sub>) koja zajedno s D<sub>C</sub> ima ulogu u regulaciji proteolitičke razgradnje proteina obitelji GLI<sup>31</sup>.

Proteini obitelji GLI krajnje su komponente signalnog puta HH. Njihova sudbina je regulirana transmembranskim proteinom Ptch1 (engl. *Patched*) i transmembranskim proteinom Smo (engl. *Smoothened*) koji se u signalnom putu HH nalaze uzvodno od proteina obitelji GLI. Naime, kada je signalni put HH u neaktivnom stanju, Ptch1 inhibira Smo, a kada je Smo neaktivan, dolazi do ubikvitinacije, fosforilacije te raznih drugih post-translacijskih modifikacija proteina obitelji GLI. Tada se protein GLI2 pune duljine (FL, engl. *full lenght*) u manjoj mjeri i protein GLI3FL u većoj mjeri proteolitički cijepaju te nastaju kraće verzije proteina kojima nedostaje TA. Takvi proteini stoga djeluju kao transkripcijski represori. S druge strane, aktivnost proteina GLI2FL i GLI3FL koji nisu proteolitički pocijepani te aktivnost proteina GLI1FL inhibirana je interakcijom s proteinom SuFu (engl. *Suppressor of Fused*). U stanicama s neaktivnim signalnim putem HH uglavnom nije prisutan protein GLI1. Kada je signalni put HH u aktivom stanju, na Ptch1 je vezan ligand HH<sup>30</sup>, a rezultat navedene interakcije je proteolitička razgradnja Ptch1 i aktivacija Smo<sup>32</sup>. Aktivirani Smo kroz mrežu proteinskih interakcija stimulira aktivaciju proteina obitelji GLI koji tada pokreću transkripciju velikog broja različitih gena<sup>30</sup>.

Signalni put HH sudjeluje u regulaciji razvoja zametka, staničnog ciklusa te u raznim drugim staničnim procesima<sup>32</sup>. U aktivnom stanju stimulira ekspresiju mnoštva gena koji su važni u regulaciji staničnog ciklusa, apoptoze, angiogeneze i epitelno-mezenhimske



tranzicije (EMT, engl. *epithelial–mesenchymal transition*). Pogreška u regulaciji bilo kojeg od navedenih procesa može rezultirati nastankom tumora, stoga je jednostavno zaključiti da je ispravna regulacija signalnog puta HH važna kako bi se spriječilo formiranje tumora<sup>33</sup>. Ispitivanja provedena na miševima ukazala su da *Ptch1*<sup>-/-</sup>, kao i prekomjerna ekspresija proteina Smo pogoduju nastanku tumora, dok *Smo*<sup>-/-</sup> smanjuje mogućnost nastanka tumora. Također, uočeno je da je pojava tumora mnogo veća kod miševa s utišanom ekspresijom proteina *Ptch1* i *p53*<sup>-/-</sup>, nego kod miševa kojima je ekspresija proteina *Ptch1* utišana, ali ekspimiraju protein p53.



Slika 3. Struktura organizacija proteina GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL. Žutom bojom označena je represorska domena (RD), sivom bojom N-terminalna domena degron (DN), narančastom motiv cinkovih prstiju (ZF), ljubičastom C-terminalna domena degron (Dc), zelenom transaktivacijska domena (TA), svijetlozelenom poveznica, crvenom područje procesiranja. Domena za procesiranje (PDD) označena smeđom bojom sadrži područje od ZF do Dc<sup>31</sup>.

### 2.3. Obitelj proteina NME

Prvi član obitelji proteina NME, protein NME1, otkriven je 1988. godine prilikom istraživanja metastatskog melanoma na mišjim modelima. Usporedbom razine mRNA koja kodira protein NME1 između melanoma manje sklonih metastaziranju i melanoma s velikom stopom metastaziranja, uočeno je da je razina mRNA koja kodira protein NME1 deset puta veća kod

melanoma manje sklonih metastaziranju. Navedena korelacija potvrđena je ispitivanjima provedenim na štakorskim modelima<sup>34</sup>. Stoga se protein NME1 smatra supresorom metastaziranja. Obitelj proteina NME u ljudi i općenito kralježnjaka čini deset proteina, od NME1 do NME10. Proteini obitelji NME podijeljeni su u dvije grupe, prvu čine proteini od NME1 do NME4, a drugu proteini od NME5 do NME9. Podjela se temelji na strukturnoj i funkcionalnoj razlici. Filogenetskom analizom utvrđeno je da su homolozi proteina obitelji NME prisutni u sve tri domene života, no u jednostavnijim organizmima broj proteina obitelji NME znatno je manji<sup>35</sup>. Najviše istraživani članovi obitelji proteina NME su proteini NME1 i NME2. Oba proteina, kao i proteini NME3 i NME4 posjeduju enzimsku aktivnost nukleozid-difosfat-kinaze (NDPK, engl. *nucleoside diphosphate kinase*), odnosno kataliziraju prijenos fosfata s nukleozid-trifosfata (NTP, engl. *nucleoside triphosphate*) na nukleozid-difosfat (NDP, engl. *nucleoside diphosphate*)<sup>36</sup>. Osim što djeluju kao NDPK, proteini NME1 i NME2 sudjeluju u prijenosu signala, djeluju kao transkripcijski faktori i proteinske kinaze, a NME1 posjeduje i 3'-5'-egzonukleaznu aktivnost. Nadalje, dokazano je da protein NME2 može potaknuti ekspresiju proto-onkogeno c-myc, dok protein NME1 može inhibirati ekspresiju PDGF (engl. *platelet-derived growth-factor*). Zahvaljujući navedenim svojstvima, proteini obitelji NME sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, endocitoze te u razvoju i diferenciji<sup>8,35,36</sup>. S obzirom na to da proteini obitelji NME sudjeluju u navedenim procesima, očekivano je da sudjeluju i u tumorogenezi. Unatoč tome što je povišena ekspresija proteina NME1 i NME2 u nekim tumorima korelirana s boljim kliničkim ishodom, u drugim vrstama tumora uočeno je da povišena ekspresija proteina NME1 i NME2 može biti povezana s lošim kliničkim ishodom. Mehanizam kojim proteini obitelji NME sudjeluju u razvoju ili supresiji tumora nije poznat, no smatra se da vjerojatno stupaju u interakciju s proteinima iz raznih signalnih puteva te tako moduliraju njihovu aktivnost<sup>37</sup>.

## 2.4. Humani melanom

### 2.4.1. Karakteristike humanog melanoma

Melanom je najrjeđi i najsmrtonosniji tumor kože, a nastaje iz melanocita<sup>38</sup>. Iako je najrjeđi, zbog svoje visoke smrtnosti odgovoran je za 75 % svih smrti prouzročenih tumorima kože. Zabrinjavajuće je da broj oboljelih od melanoma raste, a unatoč napretku u liječenju, melanom u kasnijim stadijima, odnosno, metastatski melanom, i dalje je, gotovo, neizlječiv. Pretjerana izloženost UV zračenju smatra se glavnim faktorom rizika za razvoj melanoma<sup>39</sup>. No, povećan

rizik za razvoj melanoma povezan je i s obiteljskom povijesti melanoma, velikim brojem melanocitnih nevusa, svjetlijom puti, svijetlim očima i crvenom kosom. Kod populacije sa svjetlijom puti i crvenom kosom uočene su česte mutacije gena *MC1R* (engl. *highly polymorphic melanocortin 1 receptor*) koje se smatraju odgovornima za češću pojavu melanoma u navedenoj populaciji. Naime, prilikom izlaganja UV zračenju keratinociti proizvode  $\alpha$ -MSH (engl.  *$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone*) koji se veže na G-proteinski receptor MC1R lociran na melanocitima. MC1R prenosi signal do transkripcijskog faktora MITF (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*) te slijedi otpuštanje melanina iz melanocita, a on štiti od UV-zračenja<sup>40</sup>. Kako kod navedene populacije dolazi do mutacije gena *MC1R*, dolazi do promjene u sintezi melanina. Posljedica promjene u sintezi melanina je slabija zaštita od UV zračenja te stoga dolazi do većeg broja mutacija induciranih UV zračenjem i veće mogućnosti za razvoj melanoma. S druge strane, naslijeđena mutacija gena *CDKN2A* (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) odgovorna je za 40 % melanoma koji se pojavljuju u obitelji. Mutacija gena *CDKN2A* često je uočena i u melanomima nepovezanim s obiteljskom sklonosti. Druga najčešća nasljedna mutacija je ona u genu *CDK4* (engl. *cyclin-dependent kinase 4*), no za više od 50 % melanoma koji se pojavljuju u obitelji nije poznat uzrok. Melanomi koji se pojavljuju u obitelji čine svega 8 % ukupnih melanoma, dok ostatak nije povezan s obiteljskom sklonosti<sup>39</sup>. Mutacije gena *BRAF*, *NRAS* i *NF1* (engl. *neurofibromatosis type 1*) smatraju se odgovornima za razvoj većine melanoma. Mutacije u navedenim genima dovode do stalne aktivnosti MAPK i PI3K/AKT signalnih puteva, a oni su najčešće pretjerano aktivni signalni putevi u melanomu. MAPK signalni put mutiran je u 90 % melanoma, a odmah iza njega po učestalosti mutacija slijedi PI3K/AKT signalni put<sup>40</sup>.

#### 2.4.2. Metastatski melanom

Veliki metastatski potencijal melanoma primarni je razlog njegove visoke smrtnosti<sup>38</sup>. Naime, 95 % oboljelih od melanoma s tri ili više melanomske metastaze umire unutar godinu dana. Postoje dva modela koja objašnjavaju kada dolazi do stvaranja metastaza melanoma. Prvi model pretpostavlja da do metastaza dolazi u kasnijim stadijima melanoma, odnosno, kad se akumulirao veliki broj mutacija, dok drugi model pretpostavlja da do metastaza može doći i u ranijim stadijima. Najvjerojatnije su obje teorije točne, a točan slijed događaja koji dovode do metastaziranja nije poznat. Metastaze melanoma najčešće su uočene u plućima, mozgu, jetri i kostima te se stoga smatra da je za nastanak metastaze potreban pogodan mikrookoliš koji će

omogućiti rast tumora<sup>41</sup>. Unatoč tome što melanociti nisu epitelne stanice, pokazano je da melanomi podliježu EMT te da EMT povećava metastatski potencijal melanoma. EMT je proces u kojemu stanice epitelnog fenotipa poprimaju mezenhimski fenotip te stoga postaju mobilnije. Promjena u ekspresiji kadherina važna je pojava u EMT. Naime, u raznim vrstama tumora uočeno je da je smanjena ekspresija E-kadherina i povećana ekspresija N-kadherina povezana s većom mogućnosti metastaziranja. Ispitivanjem razine E i N-kadherina u primarnom melanomu i u njegovim metastazama uočeno je da uglavnom dolazi do smanjena ekspresije E-kadherina i povećanja ekspresije N-kadherina. No, dobiveni podaci nisu bili statistički signifikantni pa se vjeruje da je proces EMT melanoma kompleksniji<sup>42</sup>. S obzirom na to da se radi o vrlo agresivnom i vrlo teško izlječivom tumoru većina pažnje bila je, do sada, usmjerena na proučavanje ranih događaja koji bi kasnije mogli rezultirati metastazama<sup>41</sup>.

#### 2.4.3. Proteini obitelji p53, NME i GLI u humanom melanomu

Mutacije gena *TP53* prisutne su u svega 10 % melanoma, no unatoč tome, protein p53 ne obavlja svoju funkciju tumorskog supresora u gotovo 90 % melanoma. Jedan od pristupa liječenju metastatskog melanoma temelji se na obnavljanju aktivnosti proteina p53, no dosadašnji pokušaji takvog pristupa pokazali su se neuspješnima. Smatra se da česta mutacija gena *CDKN2A* čini mutaciju gena *TP53* nepotrebnom, no navedeno je uočeno samo u određenim slučajevima. Gen *CDKN2A* kodira tumorske supresore INK4A i ARF, a ARF je važan u regulaciji razine proteina p53. Protein iASSP (engl. *inhibitor of apoptosis stimulating protein of p53*) u melanomima se može pronaći prvenstveno u fosforiliranom obliku. Fosforilirani iASSP migrira iz citoplazme u jezgru te tamo vezanjem za protein p53 inhibira njegovu aktivnost. Nadalje, utjecaj različitih izoformi obitelji proteina p53 na aktivnost p53 razjašnjen je u prethodnom tekstu. Uzimajući navedeno u obzir, čini se da postoji više načina na koje bi se mogla povratiti aktivnost proteinu p53, a često se cilja na komponente signalnih puteva MAPK i PI3K/AKT<sup>4</sup>.

Uočeno je da proteini GLI1 i GLI2 zbog svoje TA koja je strukturno slična TA proteina p53 kompetiraju za vezanje na transkripcijski koaktivator TAF9 (engl. *TATA Binding Protein Associated Factor 9*). Protein p53 veže TAF9 većim afinitetom od proteina GLI1 i GLI2 te tako regulira signalni put HH. Kako je prekomjerna ekspresija proteina obitelji GLI povezana s određenim tumorima, smatra se da u takvim slučajevima dolazi do prevelike razine proteina obitelji GLI da bi protein p53 mogao regulirati njihovu aktivnost. Također, kako je u većini

melanoma protein p53 neaktivan, regulacija signalnog puta HH od strane proteina p53 je već narušena<sup>6</sup>. Nadalje, uočeno je da melanomi eksprimiraju velike razine TGF- $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* ) koji se veže na serin-treoninske kinazne receptore (RSTK, engl. *receptor serine/threonine kinases*), a oni prenose signal dalje do jezgre i potiču ekspresiju proteina GLI2. Povećana ekspresija proteina GLI2 povezuje se s gubitkom ekspresije E-kadherina te povećanom agresivnošću metastatskih melanoma<sup>9</sup>. Signalni put HH bi stoga mogao imati ulogu u razvoju melanoma

Jedna od važnih interakcija proteina NME1 je ona s proteinom STARP (engl. *serine-threonine kinase receptor-associated protein*), a on potiče aktivnost fosfoinozimid-ovisne kinaze 1 (PDK1, engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) i inhibira TGF- $\beta$  signalni put. Naime, protein NME1 povećava inhibicijsko djelovanje proteina STARP na TGF- $\beta$  signalni put, a navedeni proteini su važni u regulaciji aktivnosti proteina p53. Protein NME1 interagira i s MDM2 te tako također utječe na aktivnost proteina p53<sup>5</sup>. Nadalje, smatra se da je za supresiju metastaza i za manji rizik od razvoja melanoma važna 3'-5'-egzonukleazna aktivnost proteina NME1 jer je u usporedbi s mišjim modelima koji eksprimiraju proteine NME1 i NME2, u NME1<sup>-/-</sup> i NME2<sup>-/-</sup> uočen puno sporiji popravak DNA oštećenja nastalih UV zračenjem. Dakle, uloga proteina obitelji NME u razvoju melanoma je kompleksna, a prema trenutnim spoznajama, smatra se da smanjenjem razine proteina NME1 melanom postaje genetički nestabilniji i agresivniji<sup>7,8</sup>.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

2-propanol (Kemika, Hrvatska), agar (Merck, SAD), agarozna MP (Roche, SAD), akrilamid (Sigma Aldrich, SAD), amonijev persulfat (APS; Sigma Aldrich, SAD), bisakrilamid (Sigma Aldrich, SAD), bromfenol plavo (Sigma Aldrich, SAD), deionizirana voda ( $mqH_2O$ ), destilirana voda ( $dH_2O$ ), dimetil-sulfoksid (DMSO; Kemika, Hrvatska), ditiotreitrol (DTT; Sigma Aldrich, SAD), etanol (Kemika, Hrvatska), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Kemika, Hrvatska), glicin (Kemika, Hrvatska), glicerol (Kemika, Hrvatska), kanamicin (Pliva, Hrvatska), KCl (Kemika, Hrvatska),  $KH_2PO_4$  (Kemika, Hrvatska), L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD), metanol (Kemika, Hrvatska),  $Na_2HPO_4$  (Kemika, Hrvatska), NaCl (Kemika, Hrvatska), naftol plavo (Kemika, Hrvatska), natrijev dodecil sulfat (SDS; Sigma Aldrich, SAD), natrijev piruvat (Gibco, Termo Fisher Scientific, SAD), NP-40 (Calbiochem, SAD), obrano mlijeko u prahu (Dukat, Hrvatska), octena kiselina (Kemika, Hrvatska), penicilin (Gibco, Termo Fisher Scientific, SAD), serum fetusa goveda (FBS; Gibco, Termo Fisher Scientific, SAD), streptomycin (Gibco, Termo Fisher Scientific, SAD), N, N, N, N-tetrametiletildiamin (TEMED; Sigma Aldrich, SAD), tripsin (Sigma Aldrich, SAD), Tris-baza (Sigma Aldrich, SAD), Tween-20 (Sigma Aldrich, SAD).

#### 3.1.2. Otopine i puferi

**10 x pufer za SDS-PAGE (10 x RB):** 25  $mmol\ dm^{-3}$  Tris-baza, 192  $mmol\ dm^{-3}$  glicin, 0,1 % (w/v) SDS,  $dH_2O$ . **10 x pufer za prijenos proteina (10 x TB):** 184  $mmol\ dm^{-3}$  Tris-baza, 140  $mmol\ dm^{-3}$  glicin,  $dH_2O$ . **10 x pufer TBST** (engl. *Tris buffered saline Tween*): 150  $mmol\ dm^{-3}$  NaCl, 50  $mmol\ dm^{-3}$  Tris-HCl, 0,1 % (v/v) Tween-20,  $dH_2O$ . **4 x pufer Laemmli**, pH 6,8: 0,2  $mol\ dm^{-3}$  Tris-HCl, 0,4  $mol\ dm^{-3}$  DTT, 8 % (w/v) SDS, 40 % (w/v) glicerol, 0,001 % (w/v) bromfenol plavo,  $dH_2O$ . **5 x pufer za nanošenje uzorka DNA:** 0,25 % (w/v) bromfenol plavo, 0,25 % (w/v) ksilen cijanol, 35 % (w/v) glicerol,  $dH_2O$ . **Fosfatni pufer, PBS** (engl. *Phosphate buffered saline*), pH 7,4: 8  $g\ dm^{-3}$  NaCl, 0,2  $g\ dm^{-3}$  KCl, 1,44  $g\ dm^{-3}$   $Na_2HPO_4$ , 0,24  $g\ dm^{-3}$   $KH_2PO_4$ ,  $dH_2O$ . **Matična otopina akrilamida i bisakrilamid (AAS):** 29,2 % (w/v) akrilamid, 0,8 % (w/v) bisakrilamid. **Otopina APS-a za pripravu**

**poliakrilamidnog gela:** 10 % (w/v) APS, dH<sub>2</sub>O. **Otopina SDS-a za pripravu poliakrilamidnog gela:** 10 % (w/v) SDS, dH<sub>2</sub>O. **Otopina za odvajanje stanica od podloge:** 0,25 % (w/v) tripsin, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA . **Otopina za bojanje membrane:** 1 g dm<sup>-3</sup> naftol modro, 10 % (v/v) metanol, 2 % (v/v) octena kiselina, dH<sub>2</sub>O. **Otopina za odbojavanje membrane:** 40 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) octena kiselina, dH<sub>2</sub>O. **Otopina za blokiranje membrane:** 5 % (w/v) obrano mlijeko u prahu otopljeno u puferu 1 × TBST. **Pufer za pripravu poliakrilamidnog gela za sabijanje,** pH 6,8: 1 mol dm<sup>-3</sup> Tris, dH<sub>2</sub>O. **Pufer za pripravu poliakrilamidnog gela za razdvajanje,** pH 8,8: 1,5 mol dm<sup>-3</sup> Tris, dH<sub>2</sub>O. **Pufer TENN:** 50 mmol dm<sup>-3</sup> Tris (pH 7,5), 5 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, 0,5 % (v/v) NP-40, 150 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, dH<sub>2</sub>O. **Pufer TE** (engl. *Tris-EDTA buffer solution*): 10 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCL, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, dH<sub>2</sub>O. **Pufer TAE** (engl. *Tris-acetate-EDTA*): 40 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 20 mmol dm<sup>-3</sup> octena kiselina, 1 mmol dm<sup>-3</sup> EDTA, dH<sub>2</sub>O.

### 3.1.3. Komercijalni kompleti

**Komercijalni komplet za izolaciju plazmida:** *NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi* (Macherey-Nagel, Njemačka). **Komercijalni komplet za određivanje koncentracije proteina:** *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD). **Komercijalni kompleti za detekciju proteina kemiluminiscencijom:** *Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska), *SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD), *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD).

### 3.1.4. Stanična linija

**Stanična linija:** A375M (ATCC<sup>®</sup> CRL\_1619<sup>™</sup>), stanice metastatskog melanoma.

### 3.1.5. Bakterijski soj

**Bakterijski soj:** *Escherichia coli* soj DH5α (Termo Fisher Scientific, USA), kemokompetentne bakterije.

### 3.1.6. Hranjive podloge

**Kompletirana tekuća hranjiva podloga RPMI 1640** (engl. *Roswell Park Memorial Institute*) korištena za uzgoj stanične linije A375M pripravljena je od 500 mL tekuće hranjive podloge RPMI 1640 (Lonza, Belgija), 10 % (v/v) FBS, 1 mmol dm<sup>-3</sup> natrijevog piruvata, 2 mmol dm<sup>-3</sup>

L-glutamina, 100 jedinica  $\text{cm}^{-3}$  penicilina i 100  $\mu\text{g cm}^{-3}$  streptomicina. **Krioprotektivna tekuća hranjiva podloga** korištena za smrzavanje stanice pripravljena je od 45 % (v/v) tekuće hranjive podloge RPMI 1640, 45 % (v/v) FBS-a i 10 % (v/v) DMSO. **Reducirana tekuća hranjiva podloga Opti-MEM<sup>®</sup>** (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD) korištena je za pripremu transfekcijske smjese. **Tekuća hranjiva podloga Luria-Bertani (LB)** korištena za uzgoj transformiranih bakterija pripravljena je od 5  $\text{g dm}^{-3}$  ekstrakta kvasca, 10  $\text{g dm}^{-3}$  NaCl-a, 10  $\text{g dm}^{-3}$  triptona, 50  $\text{mg dm}^{-3}$  kanamicina u  $\text{dH}_2\text{O}$ . **Kruta hranjiva podloga LB-agar** korištena za odabir transformirane kolonije za uzgoj pripravljena je od tekuće hranjive podloge LB i 13  $\text{g dm}^{-3}$  agara.

### 3.1.7. Protutijela

Popis i karakteristike primarnih protutijela prikazane su u tablici 1, dok su popis i karakteristike sekundarnih protutijela prikazane u tablici 2.

Tablica 1. Prikaz primarnih protutijela i njihovih karakteristika.

| Naziv                                       | Porijeklo | Razrjeđenje | Prepoznani proteini                                |
|---|-----------|-------------|--|
| protu-FLAG (Sigma-Aldrich, SAD)             | Miš       | 1:1000      | Proteini označeni afinitetnim privjeskom FLAG      |
| DO1 (Santa Cruz Biotechnologies, SAD)       | Miš       | 1:2000      | Izoforme p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ i p53 $\gamma$ |
| protu-p73 (Abcam, UK)                       | Kunić     | 1:2000      | Sve izoforme proteina p73                          |
| protu-GLI1 (Cell Signaling Technology, SAD) | Kunić     | 1:1000      | Protein GLI1                                       |
| protu-GLI2 (Aviva Systems Biology, SAD)     | Kunić     | 1:1000      | Protein GLI2                                       |



|   |       |        |                              |
|---|-------|--------|------------------------------|
| protu-GLI3<br>(ProteinTech, SAD)  | Kunić | 1:600  | Protein GLI3                 |
| protu-NME1/2<br>(Dobiveno<br>ljubaznošću dr.sc. I.<br>Lascu i dr.sc. S.<br>Volarević) | Kunić | 1:3000 | Proteini NME1 i<br>NME2      |
| SAPU (Dobiveno<br>ljubaznošću dr.sc.<br>J.C. Bourdona,<br>Dundee, UK)                 | Ovca  | 1:5000 | Sve izoforme<br>proteina p53 |

Tablica 2. Prikaz sekundarnih antitijela i njihovih karakteristika

| Naziv  | Porijeklo | Razrjeđenje |
|--|-----------|-------------|
| Protuovčje protutijelo<br>konjugirano s peroksidazom<br>iz hrena (Jackson Immuno<br>Research, SAD) | Magarac   | 1:10000     |
| Protukunićje protutijelo<br>konjugirano s peroksidazom<br>iz hrena (GE HealthCare,<br>UK)          | Miš       | 1:3000      |
| Protumišje protutijelo<br>konjugirano s peroksidazom<br>iz hrena (Jackson Immuno<br>Research, SAD) | Ovca      | 1:10000     |

### 3.1.8. Standardi i markeri veličine

**DNA-biljeg** *1 Kb Plus DNA Ladder* raspona od 0,1 do 12 kb (Thermo Fisher Scientific, SAD).  
**Marker veličine za određivanje molekulske mase proteina** raspona od 10 do 250 kDa (BioRad, SAD). Albumin iz seruma goveda (BSA, engl. *bovine serum albumin*) - **standard za**

**određivanje koncentracije proteina**, korištene koncentracije 125, 250, 500, 750, 1000, 1500  $\mu\text{g cm}^{-3}$ .

### 3.1.9. Ostali materijali

**Agarozna zrnca za koimunoprecipitaciju**: suspenzija agaroznih zrnaca s kovalentno vezanim protu-FLAG protutijelom. **Inhibitori proteaza** *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Švicarska). **Reagens za transfekciju** *Turbofect* (Thermo Fisher Scientific, SAD). **Fluorescentna boja za vizualizaciju DNA** *Midori green* (Bulldog-Bio, SAD).

### 3.1.10. Laboratorijski pribor

Automatske pipete za razne raspone volumena u području od 0,5 do 1000  $\mu\text{L}$  uz odgovarajuće nastavke (Eppendorf, Njemačka), Filter papiri, Petrijeve zdjelice promjera 100 mm (Falcon, Corning Incorporated, SAD), plastične epruvete volumena 15 mL (Falcon, Corning Incorporated, SAD), staklene epruvete volumena 15 mL, mikroepuvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka), mikrotitarske pločice s 96 jažica (Falcon, Corning Incorporated, SAD), Krio-tubice volumena 2 mL (Greiner Bio-One, Njemačka), Erlenmayerove tikvice volumena 250 mL, staklene čaše raznih volumena, menzure raznih volumena, parafilm, strugalica, nitrocelulozna membrana veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman, GE Healthcare, UK).

### 3.1.11. Uređaji

Centrifuga *Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital* (MSE, UK), Centrifuga tip *5414 R* (Eppendorf, Njemačka), inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija), kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija), zibalica *Gyro-rocker SSL3* (Stuart<sup>®</sup>, Cole-Parmer Ltd., UK) magnetska miješalica *MSH Basic* (Ika, Njemačka), spektrofotometar *NanoPhotometer<sup>®</sup> N60* (Implen, Njemačka), spektrofotometar za mikrotitarske pločice *Multiskan MS* (Labsystems, Finska), sustav za elektroforezu *Mini-Protean II* (BioRad, SAD), sustav za prijenos proteina *Mini Trans-Blot* (BioRad, SAD), termoblok *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Njemačka), tresilica za bakterije *Unimax 1010* (Heidolph, Njemačka), tresilica za mikrotitarske pločice tip *715* (Asal, Italija), ultrazvučni sonikator *Labsonic<sup>®</sup> M*, sonda promjera 1 mm (Montreal Biotech, Kanada), uređaj za vizualizaciju *Alliance 4.7* (UVItect, UK), uređaji za napajanje *Power Pac Basic Power Supply* i *PowerPac 300* (BioRad, SAD), vaga tip *PM 4000* (Mettler Toledo, SAD), vodena kupelj za mikrotitarske pločice, tip *1083* (GFL, Njemačka).

## 3.2. Metode rada s bakterijskim kulturama

### 3.2.1. Transformacija kemokompetentnih bakterija *Escherichia coli*

Glicerolska kultura kemokompetentnih bakterija *E. coli* soj DH5 $\alpha$  korištena je za transformaciju s plazmidnom DNA. Odrađene su dvije transformacije, jedna s plazmidnom DNA koja kodira protein  $\Delta 133p53\alpha$  (pcDNA3- $\Delta 133p53\alpha$ ) i druga s plazmidnom DNA koja kodira protein  $\Delta 133p53\beta$  (pcDNA3- $\Delta 133p53\beta$ ). Ostatak plazmidnih DNA koje su kasnije korištene bio je dostupan u dovoljnoj količini te njihovo umnažanje nije bilo potrebno. U mikroepruvetu s 50  $\mu$ L bakterijske suspenzije dodano je 1  $\mu$ L plazmidne DNA te je inkubirana od 5 do 30 minuta na ledu. Potom slijedi inkubacija bakterijske suspenzije od 30 do 45 sekundi pri 42 °C. Naglim izlaganjem suspenzije kemokompetentnih bakterija s plazmidnom DNA visokim temperaturama dolazi do toplinskog šoka prilikom kojeg plazmidni vektor ulazi u bakterije. Nakon toplinskog šoka, bakterijskoj suspenziji doda se 200  $\mu$ L tekuće hranjive podloge LB te se inkubira 5 minuta na ledu kako bi se bakterije oporavile. Zatim se bakterijska suspenzija inkubira od 45 do 60 minuta pri 37 °C na tresilici za bakterije *Unimax 1010* (Heidolph, Njemačka) uz stalnu trešnju od 300 okretaja u minuti (rpm). Nakon inkubacije, bakterijska suspenzija se nasadi na pripremljene Petrijeve zdjelice s krutom hranjivom podlogom LB-agar i pogodnim antibiotikom, u ovom slučaju kanamicinom. Petrijeve zdjelice s nasadenim bakterijama inkubiraju se preko noći pri 37 °C.

### 3.2.2. Umnažanje odabrane transformirane bakterijske kolonije

Nakon prekonodne inkubacije transformiranih bakterija na Petrijevim zdjelicama s krutom hranjivom podlogom LB-agar i kanamicinom, narasle su samo bakterije koje su primile plazmidni vektor jer on sadrži gen za rezistenciju na kanamicin. Prilikom odabira bakterijske kolonije traži se pogodna kolonija oko koje nisu vidljive satelitske kolonije. Prije odabira kolonije pripremi se Erlenmayerova tikvica sa 100 mL tekuće hranjive podloge LB s kanamicinom. Odabrana bakterijska kolonija inokulira se sterilnim nastavkom za automatsku pipetu te se zajedno sa sterilnim nastavkom prebaci u prethodno pripremljenu Erlenmayerovu tikvicu. Zatim se navedena Erlenmayerova tikvica inkubira preko noći pri 37 °C na tresilici uz stalnu trešnju od 250 rpm.

### 3.2.3. Izolacije plazmidne DNA

Nakon umnažanja odabrane transformirane bakterijske kolonije slijedi izolacija plazmidne DNA. Plazmidna DNA iz transformiranih bakterija izolirana je korištenjem komercijalnog kompleta *NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi* (Macherey-Nagel, Njemačka). Izolacija se provela prema uputama za izolaciju plazmida s velikim brojem kopija dobivenim uz komercijalni komplet, a za eluiranje plazmidne DNA korištena je mqH<sub>2</sub>O. Nakon izolacije, koncentracija plazmidne DNA određena je spektrofotometrom *NanoPhotometer<sup>®</sup> N60* (Implen, Njemačka). Koncentracija plazmidne DNA određena je iz 1 µL uzorka, a kao slijepa proba korištena je mqH<sub>2</sub>O. Nakon što joj se odredi koncentracija, izolirana plazmidna DNA pohrani se na -20 °C.

### 3.2.4. Provjera kvalitete izolirane plazmidne DNA elektroforezom u agaroznom gelu

Kvaliteta izolirane plazmidne DNA provjerena je elektroforezom u 0,8 % agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,3 g agaroze u 40 mL pufera TAE uz zagrijavanje do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Mikrovalno zagrijavanje smjese agaroze i pufera TAE potrebno je kako bi se agarozna otopila. Nakon što je sva agarozna otopljena, otopina se ostavi na sobnoj temperaturi sve dok ne poprimi temperaturu od oko 40 °C. Kada se otopina dovoljno ohladila, doda joj se 3 µL fluorescentne boje *Midori Green* (Bulldog-Bio, SAD). Ohlađena otopina agaroze u puferu TAE s dodanom fluorescentnom bojom izlije se u kadicu za elektroforezu kako bi otopina polimerizirala. Prilikom izlivanja navedene otopine u kadicu za elektroforezu postavljen je češljic koji je važan da bi se u gelu formirala mjesta za nanošenje uzorka, odnosno jažice. Nakon polimerizacije, gel je postavljen u vodoravni sustav za elektroforezu *Mini-Protean II* (BioRad, SAD) te se u sustav ulio pufer TAE do odgovarajuće oznake. Neposredno prije elektroforeze potrebno je pripremiti uzorke za nanošenje na gel. Uzorci su pripremljeni formiranjem kapljice s 4 µL pufera TE, 1 µL 5 x pufera za nanošenje uzorka DNA i 100 ng plazmidne DNA na parafilmu. Pripremljeni uzorci nanose se u odgovarajuće jažice na gelu, dok se u prvu jažicu nanosi 2,5 µL DNA-biljega, *1 Kb DNA ladder* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza se odvija 30 minuta pri naponu od 50 V, pri sobnoj temperaturi. Nakon završetka elektroforeze razdvojena plazmidna DNA vizualizira se snimanjem fluorescencije na uređaju za vizualizaciju *Alliance 4.7* (UVItec, UK).

### 3.3. Metode rada sa staničnim kulturama

Svi navedeni postupci rada sa staničnim kulturama napravljeni su u sterilnim uvjetima, sa sterilnim priborom i sterilnim otopinama.

#### 3.3.1. Odmrzavanje stanica

Stanična linija A375M pohranjuje se u tekućem dušiku pri  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  u krio-tubicama s krioprotektivnom tekućom hranjivom podlogom. Postupak odmrzavanja stanica potrebno je provoditi pažljivo jer je tekući DMSO iz krioprotektivnog medija toksičan za stanice. Stoga se prilikom odmrzavanja stanica, stanice samo djelomično otope te odmah prebace u sterilnu staklenu epruvetu u koju je neposredno prije izlivanja otopine sa stanicama dodano 5 mL kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640 (Lonza, Belgija). Sterilna staklena epruveta sa sadržajem centrifugira se 5 minuta pri  $1200 \times g$  na temperaturi od  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*Harrier 18/80 Refrigerated Centrifuge Digital*, MSE, UK). Nakon centrifugiranja, supernatant koji sadrži toksičan DMSO se baci, a talog stanica se resuspendira u 3 mL kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640. Suspenzija stanica se prebaci u željeni broj sterilnih Petrijevih zdjelica te se u svaku Petrijevu zdjelicu doda određeni volumen kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640 kako bi ukupan volumen medija bio 10 mL. Zatim se Petrijeve zdjelice sa stanicama stave u inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija). Inkubator za uzgoj stanica termostatiran je na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri 5 %  $\text{CO}_2$ , a atmosfera je zasićena vlagom.

#### 3.3.2. Uzgoj stanica

Popunjenost Petrijeve zdjelice s odleđenim stanicama u kompletiranoj tekućoj hranjivoj podlozi RPMI 1640 provjeri se dan nakon što su se stanice odledile, nasadile i ostavile u inkubatoru za uzgoj stanica. Kompletirana tekuća hranjiva podloga RPMI 1640, PBS i otopina za odvajanje stanica čuvaju se pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  te ih je prije uporabe potrebno ugrijati u vodenoj kupelji do  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kod daljnjeg spominjanja otopine za odvajanje koristiti će se izraz tripsin. Korištena stanična linija A375M je adherentna te raste u jednom sloju. Mrtve stanice uklanjaju se jednostavnim zamjenom medija. Uobičajeno, stanice s kompletiranom tekućom hranjivom podlogom RPMI 1640 mogu se ostaviti dva do tri dana u inkubatoru, pri čemu se svaki dan provjerava popunjenost Petrijeve zdjelice sa stanicama i broj mrtvih stanica. Također, potrebno je obratiti pažnju na boju medija jer kako kompletirana tekuća hranjiva podloga RPMI 1640 sadrži i pH indikator, fenolno crvenilo, boja medija ukazuje na pH medija. Kada medij promijeni boju iz crvene u žutu, potrebno ga je promijeniti jer navedeno ukazuje da se kiselost medija povećala,

a to je posljedica nakupljanja otpadnih produkata metabolizma stanica. Ako se boja medija ne promijeni, isti se može ostaviti sve dok stanice ne popune od 80 do 90 % podloge Petrijeve zdjelice, a tada ih je potrebno rasaditi. Prilikom rasađivanja ukloni se stari medij te se stanice isperu s 5 mL PBS-a kako bi se uklonili zaostaci seruma koji sadrži inhibitore proteaza i može inhibirati djelovanje tripsina. Zatim slijedi dodatak 1 mL tripsina i inkubacija stanica oko 3 minute u inkubatoru pri 37 °C. Stanice se djelovanjem tripsina odvoje od podloge te se potom resuspendiraju dodatkom 4 mL kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640 kako bi se inhibiralo djelovanje tripsina. Stanice se rasade prebacivanjem željenog volumena odvojenih stanica u odgovarajući broj Petrijevih zdjelica. Za održavanje stanica u kulturi nasadi se mali volumen stanica, dok se za neke druge potrebe može nasaditi veći volumen. Nadalje, na mali volumen rasađenih stanica dodaje se nova kompletirana tekuća hranjiva podloga RPMI 1640 do ukupnog volumena od 10 mL. Potom se stanice ponovno stave u inkubator i nastave uzgajati. Ako imamo dovoljno uzgojenih stanica, dio ih se može pohraniti za kasnije potrebe. Prilikom pohrane stanica potrebno im je ukloniti medij, isprati ih PBS-om, odvojiti ih od podloge dodatkom tripsina te razrijediti dodatkom kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640 kao što je prethodno opisano, no bez nasadivanja na druge Petrijeve zdjelice. Razrijeđene stanice prebace se iz Petrijeve zdjelice u sterilnu epruvetu i centrifugiraju 5 minuta pri 1200 x g na temperaturi od 4 °C. Supernatant se odbaci, a stanični talog se resuspendira u 1 mL krioprotektivnog medija te se prebaci u krio-tubicu i pohrani na -80 °C ili na -196 °C, ovisno o predviđenom vremenu čuvanja. Krioprotektivni medij osigurava polagan pad temperature te tako štiti stanice da prilikom smrzavanja ne umru.

### *3.3.3. Nasađivanje stanica za prolaznu transfekcija plazmidnom DNA*

Dan prije prolazne transfekcije stanica plazmidnom DNA, stanice je potrebno nasaditi. Stanice se nasađuju tako da na dan transfekcije popune 80 do 90 % podloge Petrijeve zdjelice. Prethodno pojašnjenim postupkom odvoje se od podloge i razrijede u 4 mL kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640. U određeni broj Petrijevih zdjelica nasadi se unaprijed određen broj stanica koji će popuniti oko 40 % podloge Petrijeve zdjelice. Nasađene stanice ostave se u inkubatoru do idućeg dana.

### *3.3.4. Prolazna transfekcija stanica plazmidnom DNA*

Ako su stanice 24 sata nakon nasađivanja dostigle popunjenost od 80 do 90 % podloge Petrijeve zdjelice, napravi se prolazna transfekcija plazmidnom DNA. Svaka transfekcija provedena je

korištenjem dvije plazmidne DNA, jedne koja kodira izoformu p53 $\alpha$  i druge koja kodira određeni protein iz obitelji proteina p53, NME ili GLI. Jedan od proteinskih partnera uvijek je označen afinitetnom oznakom FLAG. Kombinacija plazmidnih DNA korištenih za transfekciju prikazana je u tablici 3. Za svaki par plazmidnih DNA, potrebna je jedna mikroeproveta. U mikroeprovetu se otpipetira 600  $\mu$ L reducirane tekuće hranjive podloge Opti-MEM<sup>®</sup> (Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD). Zatim se dodaje 3  $\mu$ g prve plazmidne DNA, 3  $\mu$ g druge plazmidne DNA i na kraju 12  $\mu$ L reagensa za transfekciju *Turbofect* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Pripremljene otopine inkubiraju se 20 minuta. Neposredno prije nakapavanja transfekcijske smjese, stanicama se ukloni stari medij te se doda 10 mL nove kompletirane tekuće hranjive podloge RPMI 1640. Stanice s nakapanim transfekcijskim reagensom inkubiraju se 3 sata nakon čega se medij zamijeni novim kako bi se smanjila citotoksičnost, te se inkubira preko noći.

Tablica 3. Prikaz parova proteina kodiranih plazmidnim DNA korištenim za prolaznu transfekciju stanica u kulturi.

| Broj transfekcije | Protein kodiran 1. plazmidnom DNA | Protein kodiran 2. plazmidnom DNA |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1.                | p53 $\alpha$                      | $\Delta$ Np73 $\alpha$ - FLAG     |
| 2.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | $\Delta$ Np73 $\beta$             |
| 3.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | TAp73 $\alpha$                    |
| 4.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | TA73 $\beta$                      |
| 5.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | $\Delta$ 133p53 $\alpha$          |
| 6.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | $\Delta$ 133p53 $\beta$           |
| 7.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | GLI1                              |
| 8.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | GLI2                              |
| 9.                | p53 $\alpha$ -FLAG                | GLI3                              |
| 10.               | p53 $\alpha$ -FLAG                | NME1                              |
| 11.               | p53 $\alpha$ -FLAG                | NME2                              |

### 3.4. Priprema proteina za metodu Western blot

#### 3.4.1. Izolacija proteina iz transfeciranih stanica

Sakupljanje transfeciranih stanica kod kojih je protein kodiran 2. plazmidnom DNA bio  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -FLAG,  $\Delta$ Np73 $\beta$ , TAp73 $\alpha$ , TA73 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ , NME1 ili NME2 provedeno je 24 sata nakon transfekcije. S druge strane, sakupljanje transfeciranih stanica kod kojih je protein kodiran 2. plazmidnom DNA bio GLI1, GLI2 ili GLI3 provedeno je 48 sati nakon transfekcije. Navedeno vrijeme je potrebno da bi se proteini prekomjerno eksprimirali u transfeciranim stanicama. Nakon što je prošlo 24, odnosno, 48 sati, ovisno o eksprimiranom proteinu, stanicama se ukloni medij te se pažljivo isperu s 5 mL hladnog PBS-a. Isprane stanice postavljaju se na led te im se doda 3 mL hladnog PBS. Stanice se odvoje od podloge Petrijeve zdjelice pomoću strugalice te se prebace u plastičnu epruvetu. Podloga Petrijeve zdjelice zatim se ispere s 3 mL hladnog PBS kako bi se sakupile zaostale stanice te se sadržaj ponovno prebaci u istu plastičnu epruvetu. Plastična epruveta sa sakupljenim stanicama centrifugira se 5 minuta pri 1200 x g na temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja, ukloni se supernatant, a postupak se u ovom koraku može zaustaviti te se talog stanica može pohraniti na -80 °C dok se ne nastavi s izolacijom proteina. Neposredno prije nastavka postupka pripremi se 100  $\mu$ L pufera TENN s inhibitorima proteaza po jednom staničnom talogu. Stanični talog se zatim resuspendira u 100  $\mu$ L pufera TENN s inhibitorima proteaza i prebaci u mikroeprevetu. Suspenzija stanica se potom sonicira 2 puta po 10 sekundi korištenjem ultrazvučne sonde promjera 1 mm i amplitude od 80 % (*LABSONIC*<sup>®</sup> M, Montreal Biotech, Kanada). Sonikacija se odvija diskontinuirano te se stanice za vrijeme sonikacije drže u posudici s ledom kako ne bi došlo do denaturacije proteina zbog povećanja temperature uslijed sonikacije. Nakon sonikacije dolazi do pucanja staničnih membrana i oslobađanja proteina iz stanica. Stoga, da bi se uklonili ostaci membrana, nakon sonikacije slijedi centrifugiranje 20 minuta pri 13000 x g na temperaturi od 4 °C (Centrifuga tip 5414 R, Eppendorf, Njemačka). Nakon centrifugiranja, supernatant koji sadrži izolirane proteine pažljivo se prebaci u novu mikroeprevetu i pohrani na -80 °C.

#### 3.4.2. Izolacija proteina iz netransfeciranih stanica

Za kasnije potrebe prilikom analize proteinskih interakcija metodom Western blot potrebno je izolirati proteine iz netransfeciranih stanica. Proteini se izoliraju iz stanica koje su popunile od 80 do 90 % podloge Petrijeve zdjelice, a postupak sakupljanja stanica i izolacije proteina jednak je prethodno opisanom postupku za transfecirane stanice.



### 3.4.3. Određivanje ukupne koncentracije izoliranih proteina metodom BCA

Ukupna koncentracija izoliranih proteina određena je komercijalnim kompletom *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD). Sve metode rukovanja proteinima provode se na ledu. Postupak određivanja koncentracije proteina provodi se u mikrotitarskoj pločici s 96 jažica u koju se prvotno u različite jažice određenim redoslijedom nanosi 20  $\mu\text{L}$  standardnih otopina BSA u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{g cm}^{-3}$  i 20  $\mu\text{L}$  mqH<sub>2</sub>O. mqH<sub>2</sub>O služi kao slijepa proba, a serija koncentracija standardnih otopina BSA potrebna je da bi se konstruirao kalibracijski pravac. Uzorci proteina se prilikom nanošenja u jažice mikrotitarske pločice razrijede 10 puta s mqH<sub>2</sub>O. Odnosno, u svaku jažicu u koju će se nanositi uzorak proteina najprije se nanese 18  $\mu\text{L}$  mqH<sub>2</sub>O, a zatim 2  $\mu\text{L}$  proteina. Svaki uzorak proteina nanosi se u duplikatima. Zatim se za svaku popunjenu jažicu miješanjem BCA reagensa A s BCA reagensom B u omjeru 50:1 pripremi 200  $\mu\text{L}$  BCA radnog reagensa (WR, engl. *working reagent*). Pripremljeni WR dodaje se u svaku jažicu u kojoj se nalaze standardne otopine BSA, mqH<sub>2</sub>O i uzorci proteina. Zatim se mikrotitarska pločica s uzorcima stavi 1 minutu na tresilicu za mikrotitarske pločice tip 715 (Asal, Italija) te se potom poklopi i ostavi inkubirati 30 minuta pri 37 °C u vodenoj kupelji tip 1083 (GFL, Njemačka). Za vrijeme inkubacije događaju se reakcije koje rezultiraju formiranjem kompleksa s maksimumom apsorbanije pri 570 nm. Nakon inkubacije, mikrotitarska pločica se na kratko ostavi na sobnoj temperaturi kako bi se uzorci ohladili. Kada su se uzorci ohladili do sobne temperature, pločica se stavi na spektrofotometar za mikrotitarske pločice *Multiskan MS* (Labsystems, Finska) te se snimi apsorbanija pri 570 nm. Od apsorbanija standardnih otopina BSA i uzoraka oduzme se apsorbanija slijepe probe. Iz izmjerenih apsorbanija standardnih otopina BSA poznatih koncentracija konstruira se kalibracijski pravac. Prema kalibracijskom pravcu odredi se nepoznata koncentracija uzoraka proteina na temelju njihove apsorbanije. Proteinski uzorci razrijeđeni su 10 puta te, stoga, dobivenu koncentraciju treba pomnožiti s deset.

### 3.4.4. Koimunoprecipitacija izoliranih proteina

Prethodno izolirani uzorci proteina određene koncentracije izvade se s -80 °C i postavljaju na led kako bi se polagano otopili. Dok se proteini otapaju, kalibriraju se protu-FLAG-agarozna zrnca (Sigma Aldrich, SAD). Protu-FLAG-agarozna zrnca sadrže protutijelo protu-FLAG koje prepoznaje protein obilježen afinitetnim privjeskom FLAG. Stoga se ovim postupkom specifično imunoprecipitira protein obilježen afinitetnim privjeskom FLAG i proteini koji su

za njega vezani. Bočica s protu-FLAG-agaroznim zrcima se prije korištenja par puta invertira. Zatim se otpipetira 40  $\mu$ L protu-FLAG-agaroznih zrnaca u mikroeprevetu. Za svaki uzorak proteina koji kasnije analiziramo metodom Western blot potrebna je jedna mikroepreveta s protu-FLAG-agarozom po eksperimentu. Također, po svakom proteinskom uzorku potrebna je i jedna mikroepreveta s protu-FLAG-agarozom za kontrolnu koimunoprecipitaciju u kojoj se koimunoprecipitiraju proteini izolirani iz netransfeciranih stanica. U mikroeprevete s 40  $\mu$ L protu-FLAG-agaroznih zrnaca dodaje se 500  $\mu$ L pufera TENN te se mikroeprevete par puta invertiraju, centrifugiraju 30 sekundi pri 12000 x g, te se ukloni 400  $\mu$ L supernatanta. Zatim se dva puta ponovi postupak ispiranja, tj. doda 1 mL pufera TENN, mikroeprevete se par puta invertiraju i centrifugiraju 30 sekundi pri 12000 x g. Nakon svakog centrifugiranja, ukloni se 900  $\mu$ L supernatanta. Kalibriranim protu-FLAG-agaroznim zrcima dodaje se određena koncentracija proteina. U pravilu se može koristiti od 100 do 1000  $\mu$ g ukupnih proteina. Kako su analizirani proteinski partneri prekomjerno eksprimirani u transfeciranim stanicama, korišteno je 200  $\mu$ g ukupnih proteina. Kod kontrolne koimunoprecipitacije također je korišteno 200  $\mu$ g ukupnih proteina. Na temelju prethodno određene ukupne koncentracije izoliranih proteina odredi se koliki je volumen proteina potrebno dodati. Mikroeprevete se oblože parafilmom te se preko noći ostave rotirati pri 4 °C. Idućeg dana mikroeprevete se centrifugiraju 30 sekundi pri 12000 x g. Supernatant se prebaci u novu mikroeprevetu pazeći da se ne ukloni dio taloga. U talogu se nalaze protu-FLAG-agarozna zrnca na kojima je vezani protein označen afinitetnom oznakom FLAG i proteini koji su vezani na označeni protein, dok se u supernatantu nalaze svi ostali proteini. Supernatant dobiven nakon koimunoprecipitacije određenog uzorka proteina potrebno sačuvati za Western blot analizu. Tijekom daljnjeg postupka uzorci se drže na ledu kako bi se spriječila denaturacija proteina. Nakon što se uklonio supernatant, talog se dva puta ispere s 1 mL hladnog pufera PBS te se mikroepreveta par puta invertira i zatim centrifugira 30 sekundi pri 12000 x g. Nakon svakog centrifugiranja, ukloni se 900  $\mu$ L supernatanta. Treće ispiranje provodi se s 1 mL hladnog pufera PBS s 0,05 % neionskog deterdženta Tween-20. Nakon ispiranja, pažljivo se ukloni gotovo cijeli supernatant, odnosno ostavi se oko 10  $\mu$ L supernatanta u mikroepreveti. Ostavljeni supernatant potreban je za pripremu uzorka za SDS-PAGE. Koimunoprecipitirani proteini se odmah pripremaju za SDS-PAGE, a postupak pripreme uzorka objašnjen je kasnije u poglavlju 3.5.1. *Priprema uzorka za SDS-PAGE.*

### 3.5. Analiza proteina metodom Western blot

Western blot je metoda kojom se specifično detektira jedan ili više proteina u smjesi različitih proteina. Metoda uključuje razdvajanje proteina prema molekularnoj masi metodom SDS-PAGE, prijenos razdvojenih proteina iz gela na membranu, inkubiranje membrane u otopini za blokiranje nespecifičnih interakcija, vezanje primarnih protutijela na specifični protein, odnosno specifične proteine, vezanje sekundarnih protutijela sa specifičnim oznakama koje omogućuju detekciju specifičnog proteina. Različite oznake omogućuju različite načine detekcije, a u ovom slučaju korišteno je sekundarno protutijelo konjugirano s peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *Horseradish Peroxidase*) koje omogućuje kemiluminescentnu detekciju prilikom dodatka određenog supstrata.

#### 3.5.1. Priprema uzoraka za SDS-PAGE

Prije provedbe elektroforeze potrebno je pripremiti uzorke proteina, poliakrilamidni gel za razdvajanje proteina i pufer za elektroforezu. Uzorci proteina za nanošenje na gel pripremaju se iz prethodno dobivenih koimunoprecipitata uzorka proteina i kontrolnog uzorka te iz supernatanta odvojenog iz uzorka proteina na kraju postupka koimunoprecipitacije. Svi uzorci se prilikom pripreme pomiješaju s puferom Laemmlia te zatim kuhaju 10 minuta pri 70 °C. Uzorak IP pripravlja se dodatkom 10 µL 2 x pufera Laemmlia u mikroepruvetu s koimunoprecipitatom, uzorak S se pripravlja tako da se od ukupnog supernatanta odvojenog na kraju postupka koimunoprecipitacije odvoji 15 µL u novu mikroepruvetu te se doda 5 µL 4 x pufera Laemmlia. Uzorak INP pripravlja se iz uzorka proteina koji je korišten za koimunoprecipitaciju. Za njegovu pripravu potrebno je volumen koji odgovara 30 µg ukupnih proteina i isti volumen 2 x pufera Laemmlia dodati u mikroepruvetu. Osim uzoraka INP, IP i S, potrebno je pripremiti i kontrolu. Kontrola (CTRL) se pripravlja dodatkom 10 µL 2 x pufera Laemmlia u mikroepruvetu s koimunoprecipitatom proteina izoliranih iz netransfeciranih stanica. Dakle, kod metode SDS-PAGE, za svaki uzorak koji se analizira potrebno je pripremiti INP, IP, S i CTRL.

#### 3.5.2. Priprema poliakrilamidnog gela i pufera za SDS-PAGE

Priprema poliakrilamidnog gela za SDS-PAGE obuhvaća pripremu gela za razdvajanje i gela za sabijanje. Gel za sabijanje je gornji gel i u njemu se formira deset jažica u koje se nanose uzorci, a gel za razdvajanje je donji gel. Gel za sabijanje je uvijek 5 %-tni poliakrilamidni gel,

dok se postotak gela za razdvajanje razlikuje ovisno o uzorku proteina koji se analizira. Naime, za proteine veće molekulske mase pripremao se gel manjeg postotka poliakrilamida, dok se za proteine manje molekulske mase pripremao gel većeg postotka poliakrilamida. Sastav smjese potreban za pripremu pojedinih poliakrilamidnih gelova i prikaz koji se postotak gela za razdvajanje koristi za analizu određenih proteina prikazan je u tablici 4. Prvotno se pripremi smjesa za gel za razdvajanje koja se ulije između dva stakalca na stalku do malo iznad dvije trećine visine stakalca. Na smjesu se pažljivo ulije dH<sub>2</sub>O te se smjesa ostavi polimerizirati. Kada je gel polimerizirao izlije se dH<sub>2</sub>O te se ulije pripremljena smjesa gela za sabijanje. U gel za sabijanje između stakalca postavi se češljic kojim se formiraju jažice u gelu. Pufer za SDS-PAGE (RB, engl. *Running Buffer*) pripravi se deseterostrukim razrjeđivanjem 10 x RB-a u dH<sub>2</sub>O.

Tablica 4. Sastav smjese potreban za pripremu poliakrilamidnih gelova i prikaz koji se postotak gela za razdvajanje koristi za analizu određenih proteina

| Vrsta gela i postotak poliakrilamida | Sastav gela   | Proteini za koje se gel koristi |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| Gel za sabijanje (5 %-tni)           | 2,7 mL dH <sub>2</sub> O, 0,67 mL AAS, 0,5 mL 1 mol dm <sup>-3</sup> Tris (pH=6,8), 0,04 mL 10 % (w/v) SDS, 0,04 mL 10 % (w/v) APS, 0,004 mL TEMED  | Svi proteini                    |
| Gel za razdvajanje (7 %-tni)         | 4,95 mL dH <sub>2</sub> O, 2,35 mL AAS, 2,5 mL 1,5 mol dm <sup>-3</sup> Tris (pH=8,8), 0,1 mL 10 % (w/v) SDS, 0,1 mL 10 % (w/v) APS, 0,007 mL TEMED | GLI1, GLI2 i GLI3               |
| Gel za razdvajanje (8 %-tni)         | 4,6 mL dH <sub>2</sub> O, 2,7 mL AAS, 2,5 mL 1,5 mol dm <sup>-3</sup> Tris (pH=8,8), 0,1 mL 10 % (w/v)  | ΔNp73α, ΔNp73β, TAp73α i TAp73β |

|                                   |   |                                    |
|-----------------------------------|---|------------------------------------|
|                                   | SDS, 0,1 mL 10 % (w/v)<br>APS, 0,006 mL TEMED   |                                    |
| Gel za razdvajanje (12 %-<br>tni) | 3,3 mL dH <sub>2</sub> O, 4,0 mL AAS,<br>2,5 mL 1,5 mol dm <sup>-3</sup> Tris<br>(pH=8,8), 0,1 mL 10 % (w/v)<br>SDS, 0,1 mL 10 % (w/v)<br>APS, 0,004 mL TEMED | Δ133p53α, Δ133p53β,<br>NME1 i NME2 |

### 3.5.3. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

SDS-PAGE je metoda kojom se razdvajaju proteini primjenom električne struje. Poznato je da su proteini nabijene makromolekule, a naboj im proizlazi iz bočnih ogranaka te iz amino skupine na N-kraju i karboksilne skupine na C-kraju. Na brzinu migracije proteina u poliakrilamidnom gelu utječu njegova masa, naboj i struktura. Denaturacijom proteina u SDS-u proteini poprimaju negativan naboj koji je proporcionalan njihovoj masi jer se jedna molekula SDS-a veže na dvije aminokiseline. Rezultat je maskiranje utjecaja strukture i naboja proteina i razdvajanje samo na temelju njihove mase.

Pripremljeni poliakrilamidni gelovi postavljaju se u okomiti sustav za elektroforezu *Mini-Protean II* (BioRad, SAD) te se potom ulije prethodno pripremljeni RB. Zatim se u jažice gelova nanose prethodno pripremljeni uzorci INP, IP, S i CTRL. Uz navedene uzorke na svaki gel potrebno je nanijeti 2 μL markera veličine za određivanje molekulske mase proteina (BioRad, SAD). Nakon što su uzorci nanoseni, RB se ulije do odgovarajuće oznake na sustavu te se sustav potom spoji na uređaj za napajanje (*Power Pac Basic Power Supply* ili *PowerPac 300* (BioRad, SAD)). Elektroforeza se provodi 30 minuta pri konstantnom naponu od 90 V pa se napon povisi na 110 V i tako ostavi još 60 minuta.

### 3.5.4. Prijenos razdvojenih proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu

Odmah nakon završetka elektroforeze slijedi prijenos proteina s gela na nitroceluloznu membranu. Nakon završetka elektroforeze, s poliakrilamidnog gela ukloni se gel za sabijanje. U kadu se ulije pufer za prijenos proteina (TB, engl. *Transfer Buffer*) te se s gelom za razdvajanje složi kazeta za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. Način slaganja kazete za prijenos proteina prikazan je na slici 4. Pripremljena kazeta postavi se u sustav za prijenos proteina *Mini Trans-Blot* (BioRad, SAD). U sustav se ulije dovoljno TB tako da gel i

membrana budu u puferu. U sustav se stavi i posuda s ledom te magnet kako bi se prilikom prijenosa proteina spriječilo pretjerano zagrijavanje sustava. Sustav se zatim priključi na uređaj za napajanje te stavi na magnetsku miješalicu *MSH Basic* (Ika, Njemačka). Prijenos svih uzoraka proteina osim uzoraka koji su sadržavali prekomjerno eksprimiran protein GLI1, GLI2 ili GLI3 provodio se 2 sata pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA. Uzorci s proteinom GLI1, GLI2 ili GLI3 prenosili su se preko noći pri konstantnom naponu od 13 V.



Slika 4. Način slaganja kazete za prijenos proteina.

#### 3.5.5. Bojanje proteina i blokiranje praznina na nitroceluloznoj membrani

Nakon prijenosa proteina, membrana se pažljivo prebaci u kadicu i ispere s dH<sub>2</sub>O. Potom se u kadicu dodaje otopina za bojanje membrane te inkubira 5 minuta na zibalici *Gyro-rocker SSL3* (Stuart<sup>®</sup>, Cole-Parmer Ltd., UK), a potom se otopina za bojanje membrane ukloni. Zatim slijedi ispiranje membrane dva puta po pet minuta u otopini za odbojavanje membrane. Kada su proteini obojani procijeni se uspješnost prijenosa, a membrana se potom ispire 3 puta po 10 minuta u puferu 1 x TBST uz potresanje te inkubira 30 minuta u otopini za blokiranje nespecifičnih interakcija uz potresanje.

#### 3.5.6. Vizualizacija ciljnih proteina na nitroceluloznoj membrani

Nakon blokiranja membrane kako bi se smanjile nespecifične interakcije, slijedi dodatak protutijela. Koja će se protutijela koristiti ovisi o uzorcima proteina koji se analiziraju. Jedno od primarnih protutijela uvijek je protu-FLAG protutijelo jer je jedan od proteinskih partnera uvijek označen afinitetnom oznakom FLAG, a drugo primarno protutijelo ovisi o specifičnom proteinskom partneru. Nakon svakog primarnog protutijela dodaje se sekundarno protutijelo obilježeno s HRP. Po jednoj membrani pripremi se 3,5 mL protutijela razrijeđenog u određenom omjeru s otopinom za blokiranje nespecifičnih interakcija. Omjeri u kojima se protutijela razrijeđuju prethodno su prikazani u tablicama 1 i 2. Odmah nakon inkubacije

membrane u otopini za blokiranje nespecifičnih interakcija, otopina se ukloni te se membrani doda primarno protutijelo. Sva primarna protutijela osim onih specifičnih za protein GLI1, GLI2 ili GLI3 inkubiraju se dva sata na sobnoj temperaturi uz miješanje na zibalici. S druge strane, protutijela specifična za protein GLI1, GLI2 ili GLI3 inkubiraju se preko noći pri 4 °C uz miješanje na zibalici. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, protutijelo se ukloni te se membrana ispire 3 puta po 10 minuta s 1 x TBST uz potresanje. Potom se ukloni TBST i doda sekundarno protutijelo te se membrana inkubira 45 minuta na sobnoj temperaturi uz potresanje. Sekundarno protutijelo se zatim ukloni te se membrana ispire 3 puta po 10 minuta s 1 x TBST uz potresanje. Slijedi dodatak 1,5 mL supstrata za HRP na membranu. Supstrat se na membrani ostavi oko 1 minutu pa se zatim ukloni. Membrana se potom postavi u uređaj za vizualizaciju *Alliance 4.7* (UVItec, UK) te se snimi kemiluminescencija. Ako se na membrani nalaze proteini od interesa, dodatak supstrata za HRP rezultirati će nastankom kemiluminescentnog spoja te će se pojaviti pruga na mjestu gdje se nalazi protein. Nakon vizualizacije prvog proteinskog partnera membrana se na kratko ispire u 1 x TBST-u te slijedi isti postupak s drugim protutijelom. Ovisno o količini ciljnog proteina koji se vizualizira koriste se različiti supstrati. Za većinu proteina korišten je supstrat *Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL* (PerkinElmer, Nizozemska). S druge strane, za proteine GLI1, GLI2 i GLI3 korišten je *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD) te ako pruga proteina i dalje nije dovoljno intenzivna primjeni se *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* pomiješan s *SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD). Svaki od navedenih supstrata sadrži dva reagensa koji se miješaju u omjeru 1:1. S druge strane, smjesa *SuperSignal<sup>®</sup> West Femto Maximum Sensitivity Substrate* sa smjesom *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* miješa se u omjeru 1:3.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

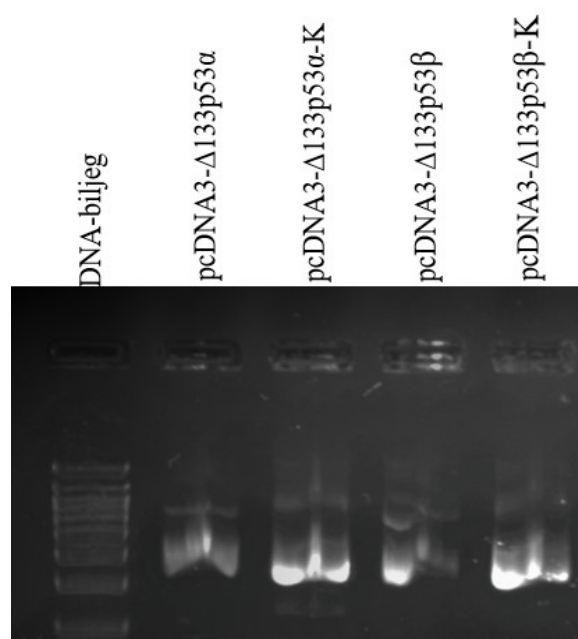
U sklopu diplomskog rada provedeno je istraživanje motivirano hipotezom da je u melanomima aktivnost divljeg tipa proteina p53 inhibirana proteinskim interakcijama. Navedena hipoteza proizašla je iz saznanja da se ekspresijski profil izoformi proteina obitelji p53 razlikuje između tumorskih i normalnih stanica te na temelju činjenice da je protein p53 neaktivan u 90 % melanoma, a mutiran u svega 10 % melanoma<sup>4,22</sup>. Stoga su u sklopu diplomskog rada ispitane interakcije između proteina p53 i određenih proteinskih partnera koji bi mogli utjecati na njegovu aktivnost. U cilju ispitivanja mogućih proteinskih interakcija, prolazno smo transfecirali stanice A375M plazmidima koji su nosili gene za dva potencijalna proteinska partnera te smo nakon njihove prekomjerne ekspresije proveli eksperiment koimunoprecipitacije. Western blot analizom ispitali smo dolazi li do interakcija između proteinskih partnera od interesa. Svi eksperimenti ponovljeni su dva puta. Jedan od proteinskih partnera gotovo uvijek bila je izoforma p53 $\alpha$ -FLAG, dok se drugi proteinski partner razlikovao u različitim slučajevima. U jednom eksperimentu umjesto izoforme p53 $\alpha$ -FLAG korištena je izoforma p53 $\alpha$  te je tada specifični proteinski partner bio označen afinitetnom oznakom FLAG. Drugi proteinski partner bio je jedan od odabranih proteina iz obitelji p53, NME ili GLI. Proteinski partneri iz navedenih obitelji odabrani su jer je do sada pokazano da stupaju u direktne ili indirektne interakcije s proteinom p53, da potencijalno mogu narušiti funkciju proteina p53 i da sudjeluju u razvoju melanoma<sup>5-9</sup>. Stoga se pretpostavlja da interakcija proteina p53 s nekim od odabranih proteinskih partnera može biti razlog njegove neaktivnosti u melanomu i u drugim tumorima koji sadrže divlji tip proteina p53.

### 4.1. Provjera umnoženih plazmidnih DNA

Za potrebe prolazne transfekcije stanične linije A375M, u kemokompetentnim bakterijama umnožene su i izolirane plazmidne DNA koje kodiraju izoforme  $\Delta 133p53\alpha$  (pcDNA3- $\Delta 133p53\alpha$ ) i  $\Delta 133p53\beta$  (pcDNA3- $\Delta 133p53\beta$ ) te se provjerila uspješnost njihove izolacije. Ostale plazmidne DNA koje se koristilo za prolaznu transfekciju bile su dostupne u dovoljnim količinama pa njih nije bilo potrebno umnožiti. Usporedba izoliranih plazmidnih DNA, pcDNA3- $\Delta 133p53\alpha$  i pcDNA3- $\Delta 133p53\beta$ , s kontrolnim plazmidnim DNA, pcDNA3-



$\Delta 133p53\alpha$ -K i pcDNA3- $\Delta 133p53\beta$ -K, prikazana je na slici 5. Usporedbom pruga izoliranih plazmidnih DNA i kontrolnih plazmidnih DNA utvrđeno je da je izolacija bila uspješna.



Slika 5. Usporedba izoliranih plazmidnih DNA, pcDNA3- $\Delta 133p53\alpha$  i pcDNA3- $\Delta 133p53\beta$ , s kontrolnim plazmidnim DNA, pcDNA3- $\Delta 133p53\alpha$ -K i pcDNA3- $\Delta 133p53\beta$ -K.

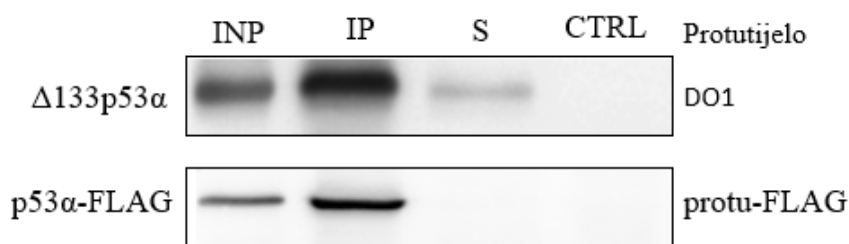
#### 4.2. Ispitivanje interakcija proteina p53 s proteinima obitelji p53, NME i GLI

Za svaki pojedini eksperiment ispitivanja interakcije između proteina p53 i određenog proteinskog partnera koimunoprecipitacijom i analizom Western blot pripravljena su četiri uzorka. Uzorak koimunoprecipitata označava se kao IP, uzorak supernatanta odvojenog na kraju postupka koimunoprecipitacije označava se kao S, uzorak izoliranih proteina s kojima nije provedena koimunoprecipitacija označava se kao INP, a uzorak koimunoprecipitata proteina izoliranih iz netransfeciranih stanica označava se kao CTRL. Uzorak CTRL je važan kako bi se nakon detekcije proteina potvrdilo da se stvarno radi o ispitivanom proteinu i isključila mogućnost da je detektiran neki drugi stanični protein. Naime, ako nakon detekcije ispitivanog proteina nema pruge u uzorku CTRL, a vidljiva je u uzorcima INP, IP i/ili S, može se zaključiti da dobivena pruga odgovara ispitivanom proteinu. Pruga u uzorku INP označava da je ispitivani protein eksprimiran. Ako se prilikom detekcije proteina obilježenog afinitetnom oznakom FLAG vidi pruga u uzorku IP, a ne vidi u uzorku S, može se zaključiti da se protein uspješno vezao na protu-FLAG-agarozna zrnca prilikom koimunoprecipitacije. Nadalje, ako se

prilikom detekcije određenog neoznačenog proteinskog partnera vidi pruga u uzorku IP, može se zaključiti da dolazi do interakcije između tog proteina i proteina obilježenog afinitetnom oznakom FLAG. S druge strane, ako je pruga odsutna u uzorku IP, a prisutna u uzorku S, može se zaključiti da ne dolazi interakcije između analiziranih proteina.

#### 4.2.1. Ispitivanje interakcija izoforme p53 $\alpha$ s izoformama $\Delta$ 133p53 $\alpha$ i $\Delta$ 133p53 $\beta$

Provelo se ispitivanje u kojem se željelo utvrditi ostvaruje li izoforma p53 $\alpha$ -FLAG interakcije s izoformama  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\beta$ . Zbog neuspjele ekspresije izoforme  $\Delta$ 133p53 $\beta$ , na slici 6 prikazan je samo rezultat ispitivanja interakcije između izoforme p53 $\alpha$ -FLAG i izoforme  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ . Na slici 6 vidljivo je da su pruge koje označavaju izoformu p53 $\alpha$ -FLAG prisutne u uzorcima INP i IP te se stoga može zaključiti da je izoforma eksprimirana i da se uspješno vezala za protu-FLAG-agarozna zrnca prilikom koimunoprecipitacije. Pruge koje označavaju izoformu  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  prisutne su u uzorcima INP i IP, no može se uočiti da je pruga slabog intenziteta prisutna i u uzorku S. Kako je pruga koja označava izoformu  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  prisutna u uzorku IP, zaključeno je da dolazi do interakcije između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ . Nadalje, pruga slabog intenziteta koja označava izoformu  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  prisutna u uzorku S ukazuje da se gotovo sva izoforma  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  vezala za izoformu p53 $\alpha$ -FLAG jer je samo mali dio materijala ostao u supernatantu nakon koimunoprecipitacije. Odsustvo pruge u uzorku CTRL potvrđuje da je detektiran specifični protein, a ne neki drugi stanični protein.



Slika 6. Ispitivanje interakcije između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  Western blot analizom. Proteini su detektirani koristeći DO1 i protu-FLAG protutijela.

Istraživanje provedeno na *S. cerevisiae* pokazalo je da izoforma  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  djeluje inhibicijski na izoformu p53 $\alpha$  i da se inhibicijsko djelovanje gubi ako se izoforma  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  ekspimirira bez funkcionalne OD<sup>29</sup>. Kako je OD potrebna za tetramerizaciju proteina p53, može se pretpostaviti da izoforma  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  inhibira aktivnost izoforme p53 $\alpha$  stvaranjem heterotetramera. Dokazana interakcija između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  ide u prilog

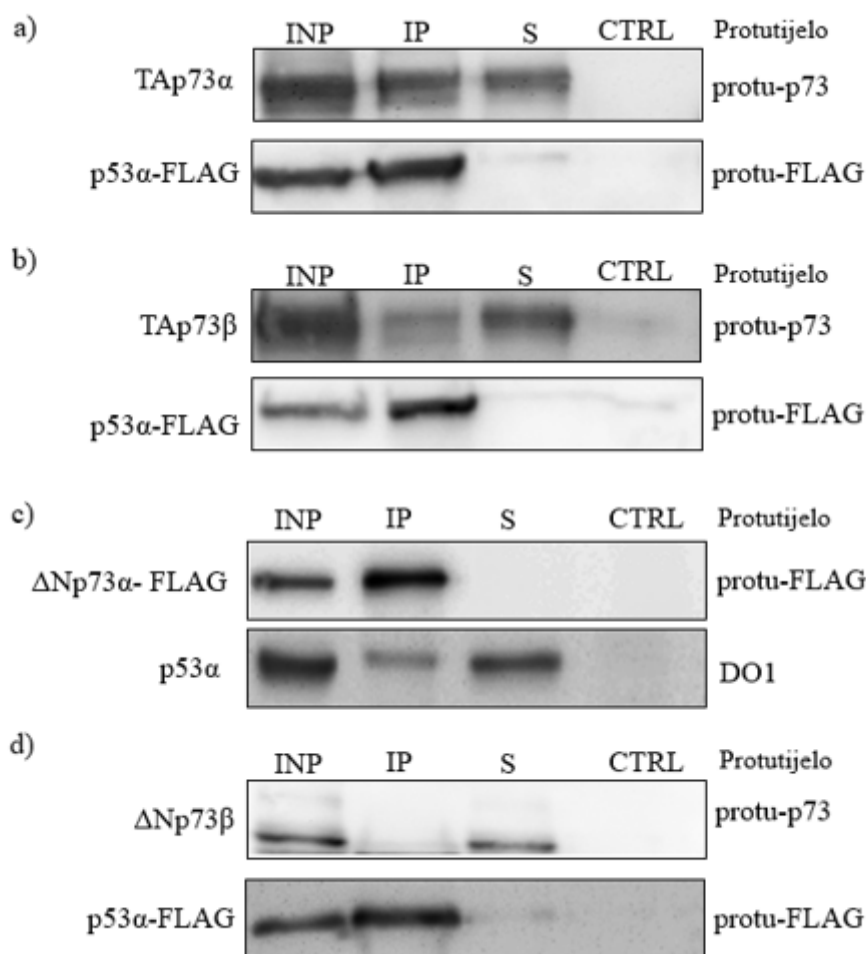
prethodnoj pretpostavci. Stoga, nije neočekivano da je za izoformu  $\Delta 133p53\alpha$  pokazano da u većim koncentracijama može djelovati kao onkogen<sup>22</sup>. Njeno onkogeno djelovanje primarno se očituje kroz inhibiciju sposobnosti izoforme  $p53\alpha$  da inicira apoptozu i kroz narušavanje mogućnosti izoforme  $p53\alpha$  da regulira stanični ciklus. Kod glioblastoma je uočeno da utišavanjem ekspresije izoforme  $\Delta 133p53\alpha$  dolazi do povećanja ekspresije izoforme  $p53\alpha$ . Kada je razina izoforme  $p53\alpha$  viša od razine izoforme  $\Delta 133p53\alpha$ , dolazi do inhibicije angiogeneze. S druge strane, kada je razina izoforme  $\Delta 133p53\alpha$  viša od razine izoforme  $p53\alpha$ , dolazi do inicijacije angiogeneze. Smatra se da izoforma  $\Delta 133p53\alpha$  ima važnu ulogu u razvoju glioblastoma jer je proces angiogeneze vrlo bitan za rast glioblastoma i drugih solidnih tumora. Kako glioblastom, kao i melanom, rijetko sadrži mutiran protein  $p53^{4,43}$ , moguće je da je izoforma  $\Delta 133p53\alpha$  važna i u razvoju melanoma. Ovisnost regulacije angiogeneze o omjeru razine izoformi  $\Delta 133p53\alpha$  i  $p53\alpha$  u glioblastomima ukazuje da bi narušen omjer izoformi obitelji  $p53$  koji je već uočen između normalnih i tumorskih stanica različitih vrsta tumora mogao biti jedan od razloga inhibicije funkcije divljeg tipa proteina  $p53$  u melanomima<sup>22</sup>.

#### 4.2.2. Ispitivanje interakcija izoforme $p53\alpha$ s izoformama $TAp73\alpha$ , $TAp73\beta$ , $\Delta Np73\alpha$ i $\Delta Np73\beta$

Ispitane su interakcije izoforme  $p53\alpha$  s izoformama  $TAp73\alpha$ ,  $TAp73\beta$ ,  $\Delta Np73\alpha$  i  $\Delta Np73\beta$ . Navedene izoforme odabrane su kao proteinski partneri jer je uočena razlika između ekspresijskog profila izoformi proteina  $p73$  u melanocitnim nevusima, melanomima i metastatskim melanomima te se smatra da bi ta promjena mogla biti jedan od razloga zbog kojih melanom pokazuje veliku otpornost na različite pristupe liječenju. Kako se razlika uglavnom vidi kroz povećanje ekspresije različitih izoformi proteina  $p73$  u melanomima, a njihova razina je najveća u metastatskom melanomu, moglo bi ih se povezati i s metastatskim potencijalom melanoma<sup>44</sup>. Nadalje, pokazano je da izoforme  $TAp73\alpha$  i  $TAp73\beta$  sudjeluju u supresiji tumora i kontroli diferencijacije<sup>24</sup>. Obje izoforme su transkripcijski aktivne, a  $TAp73\beta$  je transkripcijski najaktivnija izoforma proteina  $p73$ <sup>25</sup>. S druge strane, za izoforme  $\Delta Np73\alpha$  i  $\Delta Np73\beta$  dokazano je da inhibiraju apoptozu i da djeluju dominantno-negativno na izoforme  $TAp73$  i  $p53\alpha$ <sup>29</sup>. Interakcije između izoforme  $p53\alpha$ -FLAG i izoformi  $TAp73\alpha$ ,  $TAp73\beta$  i  $\Delta Np73\beta$  i interakcije između izoforme  $\Delta Np73\alpha$ -FLAG i izoforme  $p53\alpha$  prikazane su na slici 7.

Na slici 7 a, b i d pruga koja označava izoformu  $p53\alpha$ -FLAG prisutna je u uzorcima INP i IP te se stoga može zaključiti da je izoforma uspješno eksprimirana i imunoprecipitirana. S druge strane, na slici 7 c pruga koja označava izoformu  $\Delta Np73\alpha$ -FLAG također je prisutna u

uzorcima INP i IP pa se može zaključiti da je izoforma uspješno eksprimirana i imunoprecipitirana. Na slici 7 a pruga koja označava izoformu TAp73 $\alpha$  prisutna je u uzorcima INP, IP i S te se stoga može zaključiti da dolazi do interakcije između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i TAp73 $\alpha$ , ali je dio uzorka izoforme TAp73 $\alpha$  ostao nevezan. Na slici 8 b pruga koja označava izoformu TAp73 $\beta$  prisutna je u uzorcima INP, IP i S, ali je intenzitet pruge u uzorku IP slab. Stoga se može zaključiti da između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i TAp73 $\beta$  dolazi do interakcije, ali je dio uzorka izoforme TAp73 $\beta$  ostao nevezan. Na slici 7 c pruga koja označava izoformu p53 $\alpha$  prisutna je u uzorcima INP, IP i S, ali joj je intenzitet u uzorku IP slab. Stoga se može zaključiti da između izoformi p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -FLAG dolazi do slabe interakcije, ali je dio uzorka izoforme p53 $\alpha$  ostao nevezan. Na slici 7 d pruga koja označava  $\Delta$ Np73 $\beta$  prisutna je u uzorcima INP i S te se stoga može zaključiti da između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i  $\Delta$ Np73 $\beta$  ne dolazi do interakcije. Pruga u uzorku CTRL odsutna je u svim slučajevima pa se može zaključiti da detektirani proteini nisu neki drugi stanični proteini, već ispitivani proteini.



Slika 7. Ispitivanje interakcija između izoforme p53α-FLAG i izoformi TAp73α, TAp73β i ΔNp73β i ispitivanje interakcije između izoforme ΔNp73α-FLAG i izoforme p53α Western blot analizom. Protutijela protu-FLAG i protu-p73 korištena su za detektiranje proteina prilikom ispitivanja interakcije između izoformi p53α-FLAG i TAp73α (a), p53α-FLAG i TAp73β (b) i p53α-FLAG i ΔNp73β (d). Za detekciju proteina prilikom ispitivanja interakcije između p53α i ΔNp73α-FLAG (c) korištena su protutijela protu-FLAG i DO1.

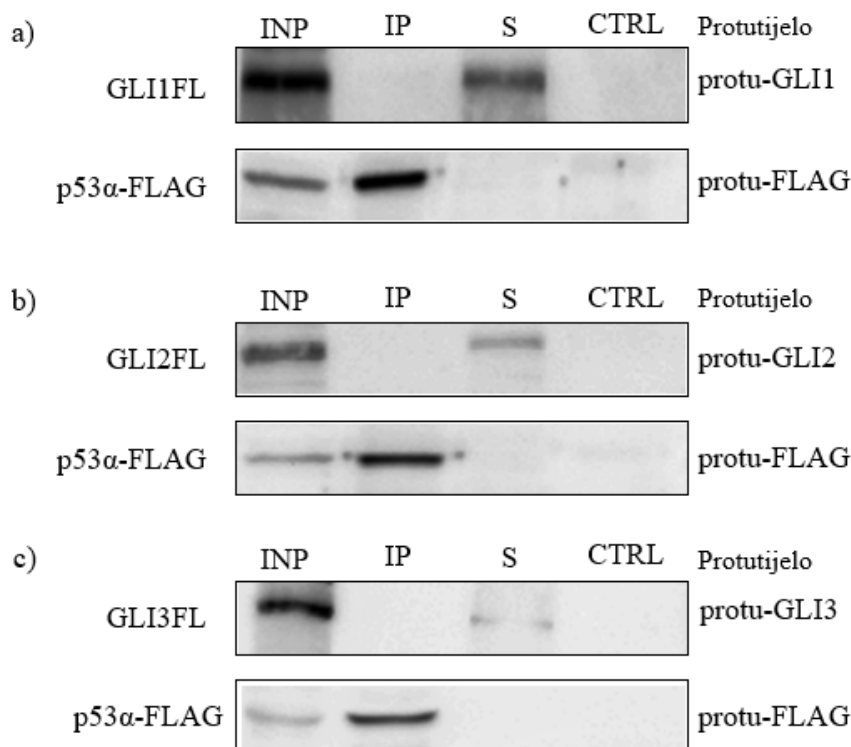
Dokazane interakcije između izoformi p53α-FLAG i TAp73α te između izoformi p53α i ΔNp73α-FLAG ukazuju da za interakciju nije potrebna TA proteina p73. S druge strane, dokazana interakcija između izoformi p53α-FLAG i TAp73β ukazuje da i β izoforme p73 ostvaruju interakciju s proteinom p53. No, dokazano je da izoforme p53α-FLAG i ΔNp73β ne stupaju u interakciju. Poznato je da se na C-kraju α izoformi proteina p73 nalazi ID te se može pretpostaviti da je ona potrebna da bi došlo do interakcije<sup>16</sup>. Smatra se da izoforma ΔNp73α inhibira funkciju izoforme p53α kroz kompetitivno vezanje na iste sljedove DNA<sup>24</sup>, no kako je

uočena interakcija između navedenih izoformi moguće je da izoforma  $\Delta Np73\alpha$  inhibira funkciju izoforme p53 $\alpha$  i kroz direktne interakcije. U slučaju interakcije između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i TAp73 $\beta$  moguće je da je do interakcije došlo putem OD. No, kako i  $\Delta Np73\beta$  izoforma sadrži OD, a za nju nije dokazana interakcija s izoformom p53 $\alpha$ , ne može se potvrditi da je u prethodnom slučaju došlo do interakcije putem OD. Poznato je da je OD potrebna kako bi proteini obitelji p53 formirali tetramere<sup>19</sup>. Stoga, interakcija između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i TAp73 $\beta$  i odsustvo interakcije između izoformi p53 $\alpha$ -FLAG i  $\Delta Np73\beta$  idu u prilog tvrdnji da protein p53 rijetko stvara tetramere s izoformama proteina p73<sup>26</sup>.

#### 4.2.3. Ispitivanje interakcija izoforme p53 $\alpha$ s proteinima GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL

Ispitane su interakcije izoforme p53 $\alpha$ -FLAG s proteinima GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL. Proteini obitelji GLI odabrani su za ispitivanje jer je dokazano da dijele istog proteinskog partnera s proteinom p53 te se pretpostavlja da protein p53 sudjeluje u regulaciji signalnog puta HH<sup>6</sup>. Protein p53 inhibira aktivnost proteina GLI1 primarno kroz onemogućavanje njegovog nakupljanja u jezgri, a kako i protein GLI1 može inhibirati aktivnost proteina p53, nastaje regulacijska petlja. Dakle, narušen omjer proteina p53 i GLI1 može rezultirati nastankom tumora. Uz navedeno, uočeno je da mutacije prisutne u signalnim putevima MPAK i PI3K/AKT povećavaju razinu proteina GLI1<sup>45</sup>. Kako su navedeni signalni putevi gotovo uvijek poremećeni u melanomu<sup>40</sup>, moguće je da je funkcija proteina p53 u melanomu inhibirana zbog povećane ekspresije proteina GLI1. Dodatna motivacija bila je spoznaja da povećana ekspresija proteina GLI2 u melanomima povećava metastatski potencijal melanoma<sup>9</sup>. Interakcije između izoforme p53 $\alpha$ -FLAG i proteina obitelji GLI prikazane su na slici 8.

Na slici 8 pruga koja označava izoformu p53 $\alpha$ -FLAG prisutna je u svim slučajevima (a, b i c) u uzorcima INP i IP te se stoga može zaključiti da je izoforma uspješno eksprimirana i imunoprecipitirana. Također, vidi se kako je pruga koja označava proteine GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL u svim slučajevima (a, b i c) prisutna samo u uzorcima INP i S. Kako nema pruge u uzorku IP može se zaključiti kako ni jedan od analiziranih proteina obitelji GLI ne ostvaruje interakcije s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG. Pruga u uzorku CTRL odsutna je u svim slučajevima pa se može zaključiti da detektirani proteini nisu neki drugi stanični proteini, već ispitivani proteini.



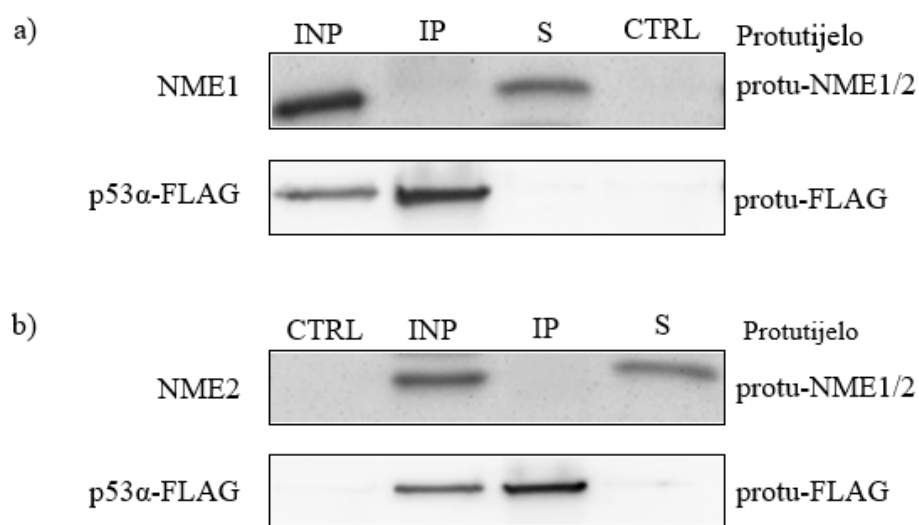
Slika 8. Ispitivanje interakcija između izoforme p53α-FLAG i proteina GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL Western blot analizom. Protutijela protu-FLAG korištena su za detekciju izoforme p53α-FLAG u a, b i c slučaju. Za detekciju proteina GLI1FL korišteno je protu-GLI1 protutijelo (a), za detekciju proteina GLI2FL korišteno je protu-GLI2 protutijelo (b), a za detekciju proteina GLI3FL korišteno je protu-GLI3 protutijelo (c).

Kako je uočeno da ne dolazi do interakcije između izoforme p53α i proteina GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL, može se zaključiti da funkcija proteina p53 nije inhibirana direktnim interakcijama s analiziranim proteinima. Stoga je vjerojatno da proteini obitelji GLI djeluju na aktivnost proteina p53 preko indirektnih interakcija ili putem transkripcijske regulacije.

#### 4.2.4. Ispitivanje interakcija izoforme p53α s proteinima NME1 i NME2

Ispitane su interakcije izoforme p53α-FLAG s proteinima NME1 i NME2. Proteini obitelji NME odabrani su za ispitivanje jer je pokazano da protein NME1 sudjeluje u supresiji metastaziranja melanoma<sup>34</sup>, a kasnije je uočeno da i NME2 u određenim tumorima može djelovati kao supresor metastaziranja<sup>37</sup>. Nadalje, za protein NME1 dokazano je da regulira aktivnost proteina p53 preko proteina STRAP i MDM2, a pokazana je i direktna interakcija proteina p53 s proteinom NME1<sup>5</sup>.

Na slici 9 vidljivo je da su pruge koje označavaju izoformu p53 $\alpha$ -FLAG prisutne u uzorcima INP i IP u oba slučaja (a i b). Stoga se može zaključiti da je izoforma uspješno eksprimirana i imunoprecipitirana. Pruge koje označavaju protein NME1 (a) i pruge koja označavaju protein NME2 (b) prisutne su u uzorcima INP i S, te se stoga može zaključiti da ni jedan od ispitivanih proteina ne ostvaruje interakciju s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG. Pruga u uzorku CTRL odsutna je u oba slučaja pa se može zaključiti da detektirani proteini nisu neki drugi stanični proteini, već ispitivani proteini.



Slika 9. Ispitivanje interakcija između izoforme p53 $\alpha$ -FLAG i proteina NME1 i NME2 Western blot analizom. Protutijela protu-FLAG i protu-NME1/NME2 korištena su za detektiranje proteina u oba slučaja.

Odsustvo interakcije proteina NME1 i NME2 s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG ne poklapa se s već objavljenim rezultatima<sup>5</sup>. No, pretragom literature nije pronađen ni jedan drugi rezultat koji bi potvrdio interakciju proteina NME1 i NME2 s proteinom p53. Stoga, proteini NME1 i NME2 na funkciju proteina p53 vjerojatno utječu samo preko neposrednih interakcije koje su ranije opisane, međutim, te nalaze će razjasniti daljnja istraživanja.



## § 5. ZAKLJUČAK

Eksperimenti na staničnoj liniji A375M pokazali su koji od ispitivanih proteina ostvaruju interakciju s izoformom p53 $\alpha$ . Za izoformu  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  dokazano je da ostvaruje interakciju s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG. Od ispitivanih izoformi proteina p73 dokazano je kako TAp73 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  ostvaruju interakciju s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG. Također, dokazana je interakcija izoforme  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -FLAG s izoformom p53 $\alpha$ . S druge strane, za izoformu  $\Delta$ Np73 $\beta$  dokazano je da ne ostvaruje interakciju s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG. Za proteine GLI1FL, GLI2FL i GLI3FL dokazano je da ne ostvaruju interakciju s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG. Za proteine NME1 i NME2 dokazano je da ne ostvaruju interakciju s izoformom p53 $\alpha$ -FLAG.

## § 6. LITERATURNI IZVORI

1. A. L. Levine, M. Oren, The first 30 years of p53: growing ever more complex, *Nat Rev Cancer* **10** (2009) 749-758.
2. C. A. Brady, L. D. Attardi, p53 at a glance, *Journal of Cell Science* **123** (2010) 2527-2532.
3. J. Wei, E. Zaika, A. Zaika, p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer, *Journal of Nucleic Acids* **2012** (2012) Article ID 687359 19.
4. N. F. Box, T. O. Vukmer, T. Terzian, Targeting p53 in melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res.* **27(1)** (2014) 8-10.
5. Jung et al, NM23-H1 Tumor Suppressor and Its Interacting Partner STRAP Activate p53 Function, *J Biol Chem.* **282(48)** (2007) 35293-35307.
6. Yoon et al, P53 Modulates The Activity Of The GLI1 Oncogene Through Interactions With The Shared Coactivator TAF9, *DNA Repair.* **34** (2015) 9-17.
7. Jarrett et al, Metastasis suppressor NM23-H1 promotes repair of UV-induced DNA damage and suppresses UV-induced melanomagenesis, *Cancer Res.* **72** (2012) 133–143.
8. Novak et al, Multiple mechanisms underlie metastasis suppressor function of NM23-H1 in melanoma, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **384** (2011) 433–438.
9. Alexaki et al, GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis, *J. Natl. Cancer Inst.* **102** (2010) 1148–1159.
10. D. P. Lane, L. V. Crawford, T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells, *Nature* **278(5701)** (1979) 261-2637
11. T. Soussi, The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms, *EMBO reports* **11(11)** (2010) 822–826.
12. Z. Sun, The General Information of the Tumor Suppressor Gene p53 and the Protein p53, *J Cancer Prev Curr Res.* **3(1)** (2015) 13.
13. C. C. Harris, p53 Tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective, *Carcinogenesis* **17(6)** (1996) 1187-1198.
14. V. Dötsch, F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi, G. Melino, p63 and p73, the Ancestors of p53, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2(9)** (2010): a004887
15. M. Ferraiuolo, S. Di Agostino, G. Blandino, S. Strano, Oncogenic intra-p53 Family Member interactions in Human Cancers, *Frontiers in Oncology* **6** (2016) 77.

16. N. Slade, A. Zorić, A. Horvat, The p53/p63/p73 family of proteins – the focus on isoforms and mutants in cancer, *Periodicum Biologorum* **112(4)** (2010) 425-432.
17. SM. Jorruiz, JC. Bourdon, p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6(8)** (2016): a026039.
18. A. Tafvizi, F. Huang, AR. Fersht, LA. Mirny, AM. van Oijen, A single-molecule characterization of p53 search on DNA, *PNAS* **108(2)** (2011) 563-568.
19. LE. Giono, JJ. Manfredi, The p53 Tumor Suppressor Participates in Multiple Cell Cycle Checkpoints, *Journal of Cellular Physiology* **209** (2006) 13-20.
20. CL. Brooks, W. Gu, New insights into p53 activation, *Cell Research* **20** (2010) 614-621.
21. K. Gnanapradeepan, S. Basu, T. Barnoud, A. Budina-Kolomets, CP. Kung, ME. Murphy, The p53 Tumor Suppressor in the Control of Metabolism and Ferroptosis, *Front. Endocrinol.* **9:124** (2018)
22. M. Vieler, S. Sanyal, p53 Isoforms and Their Implications in Cancer, *Cancers* **10(9)** 288.
23. S. Surget, MP. Khoury, JC. Bourdon, Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective, *Onco Targets Ther.* **7** (2014) 57-68.
24. N. Allocatia, C. Di Ilioa, V. De Laurenzi, p63/p73 in the control of cell cycle and cell death, *Experimental Cell Research* **318(11)** (2012) 1285-1290.
25. MP. DeYoung, LW. Ellisen, p63 and p73 in human cancer: defining the network, *Oncogene* **26** (2007) 5169–5183.
26. A. Costanzo et al, TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy, *FEBS Letters* **288** (2014) 2590-2599.
27. A. Dayakar, P. Shetty, MM. Dayakar, p63 – the master key to epithelial biology. *International Journal of Contemporary Medical Research* **5(8)** (2018) H1-H5.
28. P. Vikhreva, G. Melino, I. Amelio, p73 Alternative Splicing: Exploring a Biological Role for the C-Terminal Isoforms, *J Mol Biol* **430** (2018) 1829–1838.
29. O. Billant, A. Léon, S. Le Guellec, G. Friocourt, M. Blondel, C. Voisset, The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair, *Oncotarget* **7(43)** (2016) 69549–69564.
30. P. Niewiadomski, SM. Niedziółka, Ł. Markiewicz, T. Uśpieński, B. Baran, K. Chojnowska, Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer, *Cells* **8(2)** (2019) 147.
31. C. Gerhardt, A. Wiegering, T. Leu, U. Rütger, Control of Hedgehog Signalling by the Cilia-Regulated Proteasome, *J. Dev. Biol.* **4(3)** (2016) 27.

32. Y. Wang, J. Xie, The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation, *Arch Toxicol.* **89(2)** (2015) 179-191.
33. S.J. Scales, F.J. de Sauvage, Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy, *Trends in Pharmacological Sciences* **30(6)** (2009) 303-312.
34. P.S. Steeg, G. Bevilacqua, L. Kopper, U.P. Thotgeirsson, L.A. Liotta, M.E. Sobel, Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential, *J Natl Cancer Inst.* **80(3)** (1988) 200-204.
35. A. Bilitou, J. Watson, A. Gartner, S.I. Ohnuma, The NM23 family in development, *Mol Cell Biochem* **329** (2009) 17–33.
36. E.H. Postel, Molecules in focus NM23-NDP kinase, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30** (1998) 129-1295.
37. M.H. Bosnar, M. Radić, H. Četković, A young researcher's guide to NME/Nm23/NDP Kinase, *Periodicum Biologorum* **120(1)** (2018) 3-9.
38. Das et al, A Review Article on Melanoma, *J. Pharm. Sci. & Res.* **8(2)** (2016) 112-117.
39. D. Schadendorf, D.E. Fisher, C. Garbe, J.E. Gershenwald, J.J. Grob, A. Halpern, M. Herlyn, M.A. Marchetti, G. McArthur, A. Ribas, A. Roesch, A. Hauschild, Melanoma, *Nature Reviews Disease Primers* **1** (2015) 15003
40. Leonardi et al, Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review), *International Journal of Oncology* **52** (2018) 1071-1080.
41. W.E. Damsky, N. Theodosakis, M. Bosenberg, Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms, *Oncogene* **33** (2014) 2413–2422
42. S. Yan, B.M. Holderness, Z. Li, G.D. Seidel, J. Gui, J.L. Fisher, M.S. Ernstoff, Epithelial–Mesenchymal Expression Phenotype of Primary Melanoma and Matched Metastases and Relationship with Overall Survival, *Anticancer Res.* **36(12)** (2016) 6449-6456.
43. H. Bernard, B. Garmy-Susini, N. Ainaoui, L. Van Den Berghe, A. Peurichard, S. Javerzat, A. Bikfalvi, D.P. Lane, J.C. Bourdon, A-C. Prats, The p53 isoform, D133p53a, stimulates angiogenesis and tumour progression, *Oncogene* **32** (2013) 2150-2160.
44. S. Tuve, S.N. Wagner, B. Schittek, B.M. Putzer, Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression, *Int. J. Cancer* **108** (2004) 162–166.
45. B. Stecca, A. Ruiz, A. Altaba, A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers, *The EMBO Journal.* **28(6)** (2009) 663-676.

## § 7. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ivan Bradić

Datum rođenja: 28. studenoga 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2002–2010 Osnovna škola, Osnovna škola Slavka Kolara, Kravarsko

2010–2014 Srednja škola, Tehnička škola Ruđera Boškovića, Zagreb

2014–2017 Sveučilišni preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek

2017-2019 Diplomski sveučilišni studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb