

Ekspresija izoformi proteina p53 i p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka

Borić, Ana

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:217:804377>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Borić

**Ekspresija izoformi proteina p53 i p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva
čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr.sc. Nede Slade, zn. savjetnice IRB-a, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem dr. sc. Nedi Slade na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, savjetima, pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također zahvaljujem svim članovima Laboratorija za proteinsku dinamiku.

Zahvaljujem dr. sc. Petru Ozretiću na pomoći prilikom eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Matulić na korisnim savjetima.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji na bezgraničnoj podršci i ljubavi koju su mi pružali za vrijeme trajanja studija te bih ovaj rad posvetila upravo njima. Hvala što ste mi omogućili studiranje i podržavali me na svakom koraku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija izoformi proteina p53 i p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka

Ana Borić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Sarkomi mekih tkiva su zloćudni tumori mezenhimalnog porijekla. Mehanizam tumorigeneze sarkoma mekih tkiva još uvijek je neobjašnjen. Mutacije u genu *TP53* su najčešće genetske promjene u tumorima. Porodica p53 obuhvaća gene *TP53*, *TP63* i *TP73* koji reguliraju mnoge vitalne biološke procese, uključujući diferencijaciju stanica, proliferaciju i apoptozu. Svaki gen proizvodi proteinske izoforme kroz više mehanizama - alternativnim prekrajanjem, korištenjem alternativnih promotora te različitih mjesta početka translacije. Za razliku od p53, protein p73 prekomjerno je eksprimiran u različitim tumorima i rijetko mutiran. Cilj ovog diplomskog rada je odrediti gensku ekspresiju izoformi gena *TP53* i *TP73* te proteina p53 i p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka. Rezultati su pokazali jaču gensku ekspresiju izoformi p53 α i Δ 133p53 α , dok je analiza proteinske ekspresije pokazala višu razinu p53 α i Δ 40p53 α u staničnim linijama u kojima je *TP53* mutiran. U staničnim linijama u kojima *TP53* nije bio mutiran detektirala sam slabu ekspresiju izoformi p53 α , Δ 133p53 α i p53 β . Izoforme gena *TP73* slabo su eksprimirane u svim staničnim linijama, a jedino je protein TAp73 α značajno eksprimiran u svim staničnim linijama.

(50 stranica, 22 slika, 14 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: izoforme p53, izoforme p73, sarkom mekih tkiva

Voditelj: Dr. sc. Neda Slade, zn. savjetnica, IRB

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, PMF

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, PMF

prof. dr. sc. Božena Mitić, PMF

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner, PMF

Rad prihvaćen: 05.09.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

The expression of p53 and p73 protein isoforms in human soft tissue sarcoma cell lines

Ana Borić

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Soft tissue sarcomas are malignant tumors of mesenchymal origin. The tumorigenic mechanism of soft tissue sarcoma is still unexplained. Mutations in the *TP53* gene are the most common genetic changes in tumors. The p53 family includes the *TP53*, *TP63* and *TP73* genes that regulate many vital biological processes including cell differentiation, proliferation, and apoptosis. Each gene produces protein isoforms through multiple mechanisms – alternative splicing, use of alternative promoters and alternative translation initiation sites. Unlike p53, protein p73 is rarely mutated but is overexpressed in various tumors. The aim of this graduate thesis is to determine the expression profile of the *TP53* and *TP73* genes and p53 and p73 proteins in human soft tissue sarcoma cell lines. The results showed stronger gene expression of p53 α and Δ 133p53 α isoforms, while protein analysis revealed higher levels of p53 α and Δ 40p53 α proteins in cell lines with mutated *TP53*. In *TP53* mutant cell lines, I detected poor expression of isoforms p53 α , Δ 133p53 α and p53 β . *TP73* gene isoforms were poorly expressed in all cell lines, and only TAp73 α protein was significantly expressed in all cell lines.

(50 pages, 22 figures, 14 tables, 56 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: p53 isoform, p73 isoform, soft tissue sarcoma

Supervisor: Neda Slade, Ph.D., Senior Scientist, Ruđer Bošković Institute

Cosupervisor: Maja Matulić, Ph.D., Associate. Prof., Faculty of Science

Reviewers: Maja Matulić, Ph.D., Associate. Prof., Faculty of Science

Božena Mitić, Ph.D., Prof., Faculty of Science

Jasna Lajtner, Ph.D., Associate. Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: September 5th 2019

Sadržaj

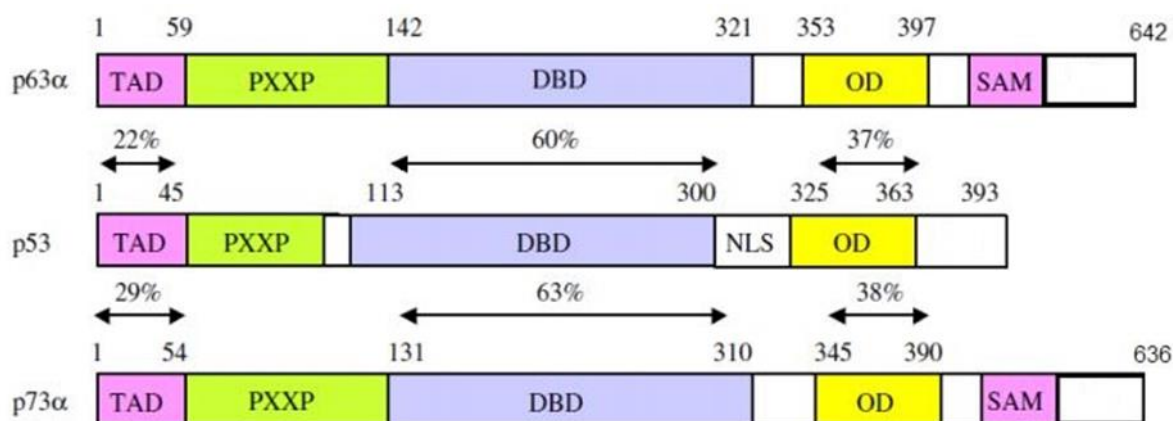
1. Uvod.....	1
1.1. Porodica proteina p53	1
1.2. Struktura članova porodice p53	2
1.3. Struktura i funkcija proteina p53	3
1.4. Izoforme proteina p53.....	7
1.5. Ekspresija izoformi p53 u tumorigenezi.....	8
1.6. Protein p73 i njegove izoforme.....	9
1.7. Međusobne interakcije proteina p53 i p73.....	10
1.8. Ekspresija izoformi p73 u tumorima	12
1.9. Sarkomi mekih tkiva.....	13
1.10. Mutacije <i>TP53</i> u sarkomima mekih tkiva.....	14
1.11. Cilj istraživanja.....	16
2. Materijali i metode	17
2.1. Materijali.....	17
2.1.1. Materijali korišteni u staničnoj kulturi.....	17
2.1.2. Otopine i puferi	18
2.1.4. Komercijalni kompleti	19
2.1.5. Ostali materijali.....	20
2.1.6. Uređaji.....	20
2.2. Metode	21
2.2.1. Odmrzavanje stanica	21
2.2.2. Održavanje stanica u kulturi	21
2.2.3. Zamrzavanje stanica.....	22
2.2.4. Analiza genske ekspresije	22
2.2.4.1. Izolacija ukupne RNA i reverzna transkripcija	22
2.2.4.2. Kvantitativni PCR metodom <i>SYBR Green-a</i>	23
2.2.4.3. qPCR s hidrolizirajućim sondama <i>TaqMan</i>	27
2.2.4.4. Obrada podataka.....	27
2.2.5. Analiza ekspresije proteina metodom Western blota.....	28
2.2.5.1. Sakupljanje stanica za izolaciju proteina	28
2.2.5.2. Izolacija proteina za analizu Western blotom	28

2.2.5.3. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA	28
2.2.5.4. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida	29
2.2.5.5. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu	30
2.2.5.6. Bojanje i blokiranje nitrocelulozne membrane	30
2.2.5.7. Analiza proteina metodom Western blota	31
3. Rezultati	32
3.1. Ekspresija izoformi gena <i>TP53</i>	32
3.2. Ekspresija izoformi proteina p53	34
3.3. Ekspresija izoformi gena <i>TP73</i>	37
3.4. Ekspresija izoformi proteina p73	37
4. Rasprava	40
5. Zaključak	43
6. Literatura	44
7. Životopis	50

1. Uvod

1.1. Porodica proteina p53

Porodicu proteina p53 čine p53, p63 i p73, koji su kodirani genima *TP53*, *TP63*, *TP73*, pokazuju veliku strukturnu sličnost, ali funkcionalno velike razlike. Ovi geni kodiraju proteine sa sličnim strukturama te imaju značajnu homologiju u transaktivacijskoj domeni, domeni koja veže DNA i oligomerizacijskoj domeni. Najveća aminokiselinska sličnost je u domeni koja veže DNA (~60%) koja je i najviše konzervirana. Manja sličnost je u oligomerizacijskoj i transaktivacijskoj domeni (~30%) (Wei i sur. 2012). Geni *TP63* i *TP73* kodiraju dodatnu regiju na C-kraju koja nije pronađena kod *TP53*, unutar koje se nalazi sterilni α -motiv (Vilgelm i sur. 2008) (Slika 1).



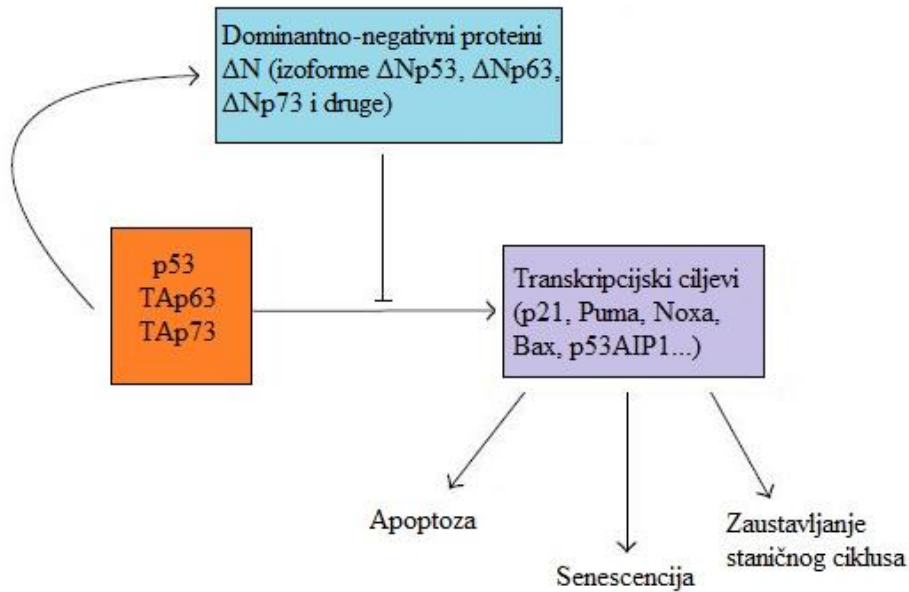
Slika 1. Sličnost u strukturi proteina p53, p63 i p73. TAD – transaktivacijska domena, PXXP-domena bogata prolinom, DBD – domena koja veže DNA, OD – oligomerizacijska domena, SAM – sterilni α -motiv, NLS – signal za smještanje u jezgru. Označeni su postotci identičnosti pojedinih domena među članovima porodice p53 kao i granični redni brojevi aminokiselina koje pojedinim domenama pripadaju (Preuzeto i prilagođeno prema Bénard i sur. 2003).

Sva tri gena imaju dva promotora koji zajedno s alternativnim prekrajanjem i različitim mjestima inicijacije translacije doprinose složenosti porodice tako da postoje brojne proteinske izoforme s različitim N- i C- krajevima (Moll i Slade 2004, Murray-Zmijewski i sur. 2006). Tumor-supresorski gen *TP53* ima ključnu ulogu u tumorigenezi – kontrolira stanični odgovor na stres potičući zastoj staničnog ciklusa i apoptozu te tako sprječava nastanak tumora (Lane i Levine 2010).

Tumor supresorski protein p53 mutiran je u približno 50% slučajeva tumora kod ljudi, za razliku od p63 i p73 koji gotovo nikada nisu mutirani u tumorima. Međutim često su prekomjerno eksprimirani (Moll i Slade 2004). Raznolikost u strukturi različitih izoformi dovodi do različitosti u unutarstaničnoj lokalizaciji, a time i u različitim biokemijskim/biološkim aktivnostima koje ovise o tipu stanice. U konačnici, stanični odgovor proteina porodice p53 zbroj je aktivnosti svih njegovih izraženih izoformi (Joruiz i Bourdon 2016, Pflaum i sur. 2014). Osim uloge u tumorigenezi, p63 i p73 imaju značajne uloge u razvoju i diferencijaciji, p63 uključen je u diferencijaciju i razvoj udova i kože (Yang i sur. 1998), a p73 ima značajnu ulogu u neurogenezi (Moll i Slade 2004).

1.2. Struktura članova porodice p53

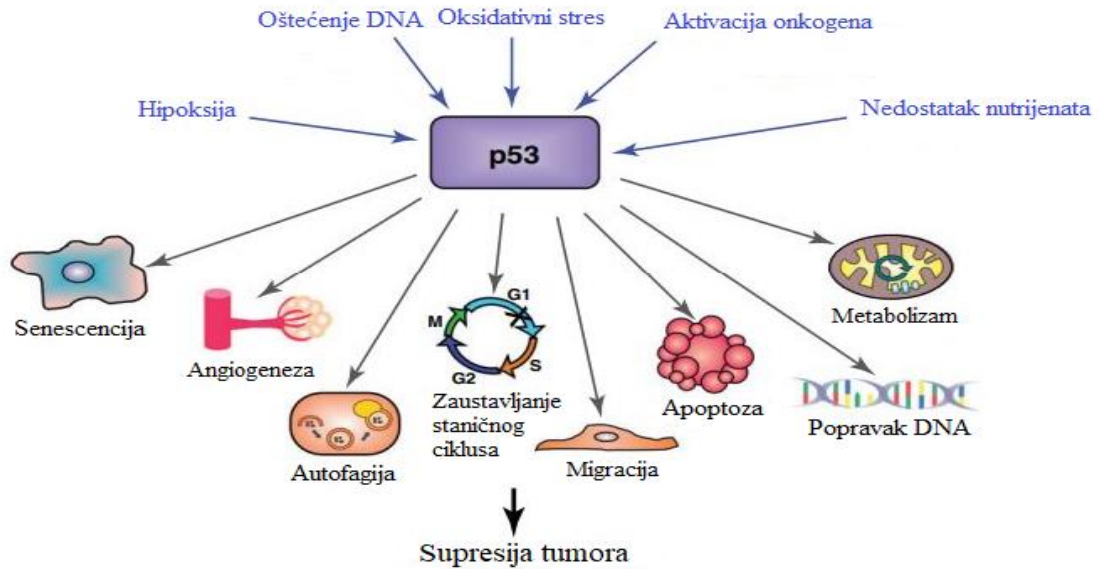
Transkripcija gena *TP53*, *TP63* i *TP73* pod kontrolom je dvaju promotora, P1 i P2, gdje je P2 alternativni unutarnji promotor. Korištenjem dva promotora, alternativnim prekrajanjima mRNA te alternativnim mjestima za početak translacije, nastaju brojne izoforme ovih proteina koje imaju različite strukture, lokalizacije u stanici te različite funkcije. Nastali transkripti i proteini mogu se općenito kategorizirati u dvije glavne skupine, nazvane TA i ΔN . Izoforme ΔN djeluju kao dominantno-negativni inhibitori izoformi TA formiranjem hetero-oligomernih kompleksa (Slika 2). Dok neke izoforme imaju onkogeni potencijal, druge mogu djelovati kao tumorski supresori. Međutim, mnoge izoforme mogu imati i onkogeni potencijal i djelovati kao tumorski supresori ovisno o vrsti stanice i tkivu u kojoj su eksprimirani (Pflaum i sur. 2014). Određene izoforme proteina p53, p63, p73 mogu tvoriti heterotetramere. Formiranje takvih miješanih heterokompleksa korelira s funkcionalnom transdominancijom – gubitkom transaktivacije ciljnih gena i proapoptotskim sposobnostima (Zorić i sur. 2012).



Slika 2. Interakcija izoformi porodice proteina p53. Izoforme p53, p63 i p73 kojima nedostaje dio N-kraja proteina imaju dominantno negativan utjecaj na transkripcijsku aktivnost izoformi p53, TAp63 i TAp73 (Preuzeto i prilagođeno prema Wei i sur. 2012).

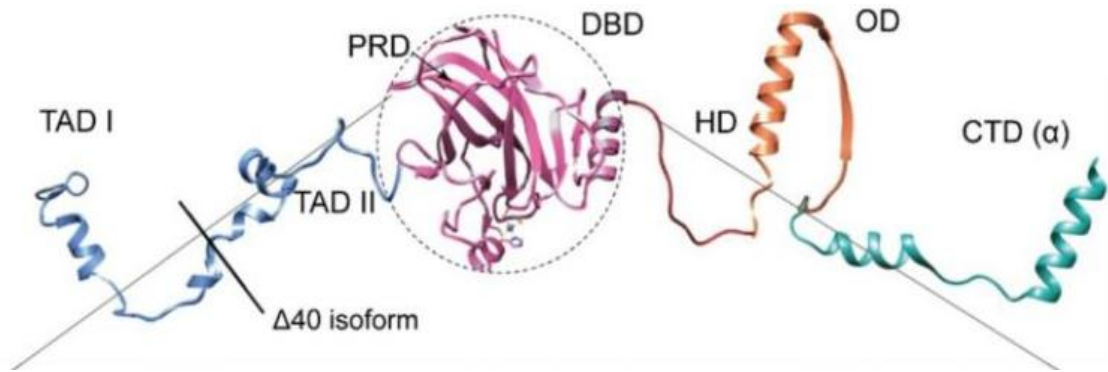
1.3. Struktura i funkcija proteina p53

Protein p53 otkriven je 1979. godine kao protein koji stupa u interakciju s onkogenim T-antigenom virusa SV40 (Murray-Zmijewski i sur. 2006). Naziva se "čuvarom genoma" jer ima ključnu ulogu u tumorigenezi. Mutacije gena *TP53* pronađene su u gotovo svim vrstama tumora i smatra se da je mutiran u više od 50% svih vrsta tumora. Većina mutacija dovodi do sinteze visoko stabilnih, neaktivnih proteina koji se akumuliraju u jezgri stanica tumora (Slade i sur. 2010). Međutim, postoje i mutacije kojima p53 stječe nove funkcije, često onkogeni potencijal te potiče stanice na ubranu diobu. p53 regulira stanične odgovore na signale stresa (oštećenje DNA, hipoksija, oksidativni stres, aktivacija onkogeni) zaustavljanjem staničnog ciklusa i induciranjem popravka DNA, a ako se oštećenje ne može popraviti, dolazi do trajnog zaustavljanja staničnog ciklusa ili apoptoze (Slika 3).



Slika 3. Aktivacija p53 različitim signalima staničnog stresa (Preuzeto i prilagođeno prema Biegging i Attardi 2012).

Sva tri člana porodice p53 formiraju tetramere u svom aktivnom obliku za što je odgovorna oligomerizacijska domena. Kod proteina p53 oligomerizacijska domena sadrži β -lanac i α -zavojnici (Joerger i sur. 2014). Protein p53 obično tetramerizira s četiri identične podjedinice i djeluje kao transkripcijski faktor. Monomeri se spajaju u dva dimera, koji se vežu na ciljno mjesto molekule DNA (engl. *p53 – responsive elements (RE)*). Protein p53 ima modularnu strukturu koja se sastoji od šest domena (Slika 4), dvije transaktivacijske domene I i II (TAD I i TAD II, engl. *transactivation domain*), domena bogata prolinom (PRD, engl. *proline-rich domain*), domena koja veže DNA (DBD, engl. *DNA-binding domain*), domena zgloba (HD, engl. *hinge domain*), oligomerizacijska domena (OD, engl. *oligomerization domain*) i C-terminalna domena (CTD, engl. *C-terminal domain*) (Vieler i Sanyal 2018).



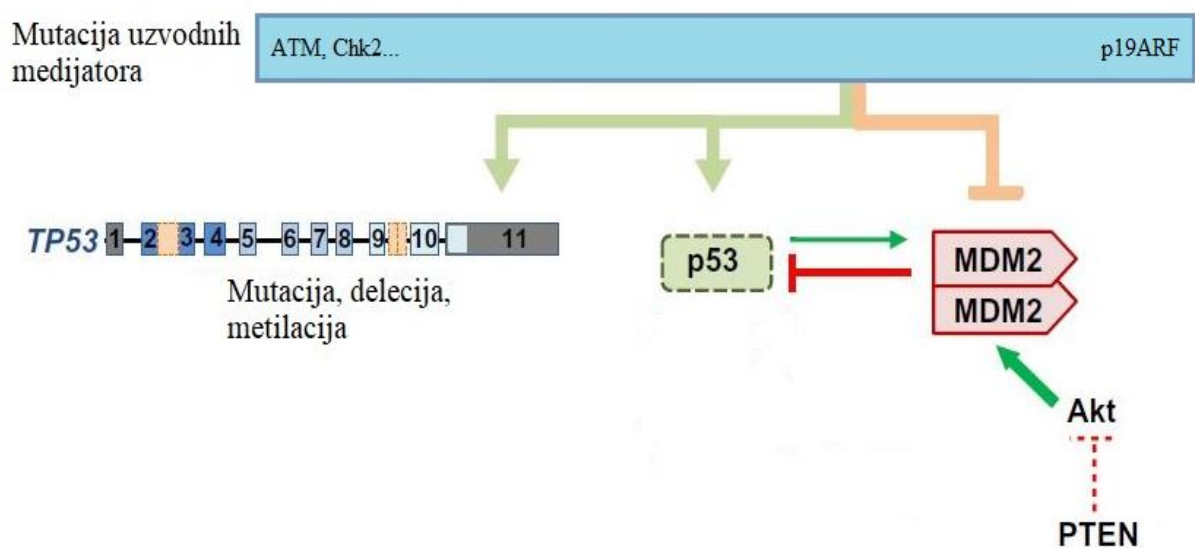
Slika 4. Struktura proteina p53 s označenim domenama. Transaktivacijske domene I i II (TAD I i TAD II), područje bogato prolinom (PRD), domena koja veže DNA (DBD, domena zgloba (HD), oligomerizacijska domena (OD) i C-terminalna domena (CTD) (Preuzeto i prilagođeno prema Vieler i Sanyal 2018).

Dvije domene na N-kraju proteina, TAD I i TAD II, mogu neovisno aktivirati transkripciju ciljnih gena i potrebne su za poticanje različitih promotora. Domene TAD I i II međusobno djeluju s različitim proteinima, uključuju transkripcijski faktor II D i II A (TFIID, TFIIA), TATA-vezujući protein (TBP), protein MDM2 (engl. *mouse double minute protein 2*), i histon acetiltransferazu p300-CREB-vezujući protein (CBP/p300). Domena bogata prolinom (PRD) povezuje transaktivacijsku domenu s domenom koja veže DNA (DBD) preko 12 prolinskih ostataka. Ova domena uključuje četiri kopije s motivima PXXP (P – prolin, X – aminokiselina). Motiv PXXP predstavlja vezno mjesto za domene SH3 (engl. *Src homology 3*), koje posreduju u interakciji protein-protein pri transdukciji signala. Domena bogata prolinom je potrebna za apoptozu i supresiju rasta potaknutom p53. Domena koja veže DNA (DBD) prepoznaje i veže se specifično na ciljno mjesto molekule DNA, p53RE, koja sadrži motiv Pu-Pu-Pu-C-(A/T)|(T/A)-G-Py-Py-Py (Pu – purin, Py – pirimidin). Vezanje DNA olakšano je interakcijama između domene koja veže DNA (DBD) i oligomerizacijske domene (OD).

Cijela domena proteina p53 na C-kraju pretežno je nestrukturirana sa samo nekoliko α -zavojnica razdvojenih nasumičnim regijama. OD formira dimere, koji zatim tvore čvrsto spojene tetramere. Na C-kraju nalazi se jezgrin izlazni signal (NES, engl. *nuclear export signal*), koji je maskiran tetramerizacijom proteina p53. Maskiranjem NES-a onemogućuje se izlaz p53 u citoplazmu, gdje ne može regulirati ekspresiju gena. Domena na C-kraju (CTD, engl. *C-terminal domain*) kontrolira strukturu i funkciju cijelog proteina te prepoznaje i veže oštećenu DNA. Vezanje DNA-CTD temelji se na elektrostatskim interakcijama niskog afiniteta između DNA i lizinskih ostataka domene na C-kraju (Vieler i Sanyal 2018).

Nakon oštećenja DNA, p53-dimeri vežu se na specifične sekvence DNA, formirajući dimer koji potiče transkripciju gena te pokreću signalni put p53 uključen u staničnu apoptozu, zaustavljanje staničnog ciklusa ili popravak DNA. Glavnu ulogu u regulaciji p53 ima protein MDM2 (engl. *mouse double minute protein 2*) koji omogućuje proteasomsku razgradnju p53 te protein p14ARF koji inhibira MDM2 i povisuje razinu p53 (Vieler i Sanyal 2018). p53 regulira gene koji sudjeluju u zaustavljanju staničnog ciklusa, npr. *p21* i *cdc25c* te gene koji dovode do apoptoze stanica *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *APAF-1*. p53 može potaknuti i program starenja stanica, senescenciju. Sva tri ishoda mogu dovesti do supresije tumora (Lane i Levine 2010).

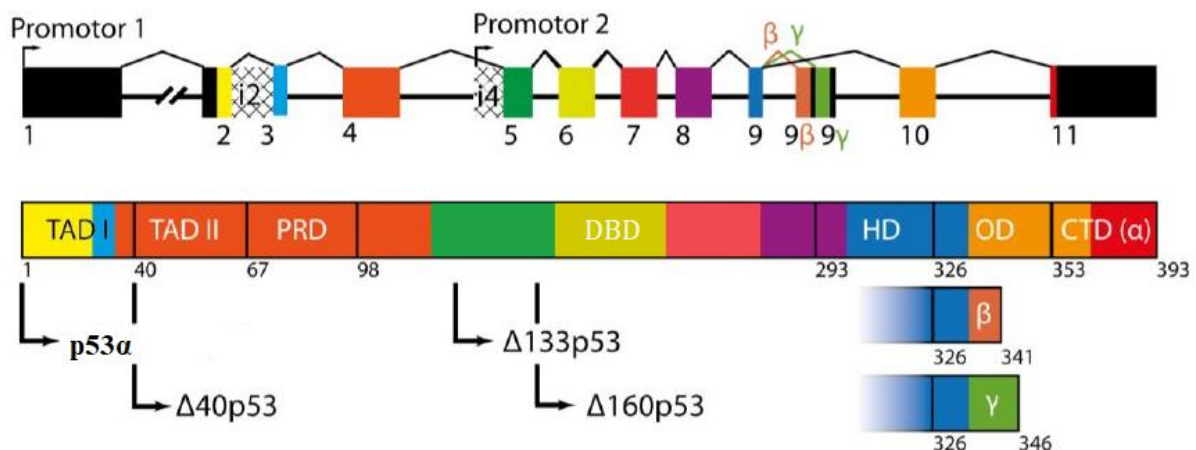
Osim inaktivacije pojačanom razgradnjom (prekomjerna ekspresija MDM2, mutacija PTEN ili INK4A/ARF) p53 može se inaktivirati u putevima uzvodnim putovima (mutacija ATM i Chk2) (Slika 5). Mutacije *TP53* uglavnom se nalaze u domeni koja veže DNA, smanjujući ili potpuno ukidajući funkciju proteina. Često je mutacija ili delecija *TP53* povezana s neuspjehom kemoterapije, progresijom tumora, metastaziranjem i kraćim preživljavanjem. Međutim, neke vrste tumora imaju nisku učestalost mutacija ili delecija *TP53* te ove projene nisu uvijek vezane uz loš ishod (Surget i sur. 2014).



Slika 5. Inaktivacija puta p53 kod tumora. Put p53 može se inaktivirati izravno mutacijom, delecijom ili metilacijom *TP53* ili indirektno mutacijom medijatora puta p53 (Preuzeto i prilagođeno prema Surget i sur. 2014).

1.4. Izoforme proteina p53

Gen *TP53* visoko je konzerviran u višestaničnim organizmima, nalazi se na kraćem kraku kromosoma 17 i sastoji se od 13 eksona od kojih je prvi nekodirajući (Joruz i Bourdon 2016). Transkripcija gena *TP53* regulirana je s dva promotora (Slika 6). Prvi promotor smješten je uzvodno od kodirajuće regije i kodira izoforme koje imaju cjelovitu transaktivacijsku domenu smještenu na N-kraju, ali i izoforme kojima nedostaje dio te domene, $\Delta 40p53$, kojoj zbog alternativnog prekrajanja nedostaje prvih 40 aminokiselina transaktivacijske domene (Vieler i Sanyal 2018). Drugi promotor, smješten unutar kodirajuće regije, kodira izoforme kojima nedostaje transaktivacijska domena, $\Delta 133p53$, a izoforme $\Delta 160p53$ nastaju korištenjem alternativnog mjesta početka translacije. Alternativnim prekrajanjem na 3' kraju molekule mRNA nastaju dodatne izoforme α , β i γ . S gena *TP53* prepisuje se 9 molekula mRNA koje kodiraju za 12 proteinskih izoformi ($p53\alpha$, $p53\beta$, $p53\gamma$, $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 40p53\beta$, $\Delta 40p53\gamma$, $\Delta 133p53\alpha$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 160p53\alpha$, $\Delta 160p53\beta$, $\Delta 160p53\gamma$) (Joruz i Bourdon 2016).



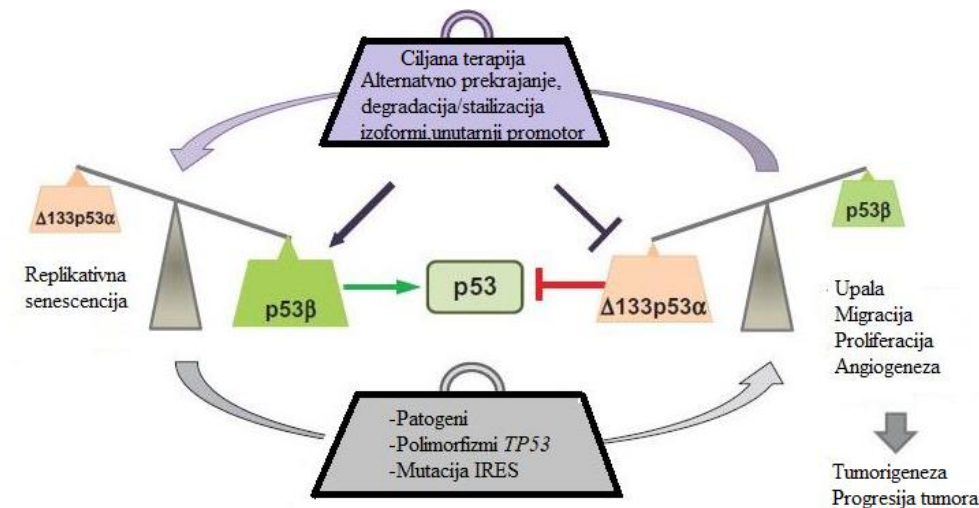
Slika 6. Struktura humanog gena *TP53*. Obojeni eksoni kodiraju za različite domene proteina p53. Promotor 1 daje transkripte s transaktivacijskom domenom, izoforme pune duljine ($p53\alpha$) i izoforme $\Delta 40p53$ ako je intron 2 zadržan u transkriptu. Promotor P2 daje transkripte koji kodiraju za izoforme $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ počevši od 133. odnosno 160. kodona. C-terminalne izoforme p53 (α , β i γ) kontroliraju se alternativnim spajanjem eksona 9. Domene proteina p53 s pripadajućim eksonima prikazane su različitim bojama, transaktivacijska domena I (TAD I), transaktivacijska domena II (TAD II), domena bogata prolinom (PRD), domena koja veže DNA (DBD), domena zgloba (HD), oligomerizacijska domena (OD), domena na C-kraju (CTD). Strelice pokazuju početak N-kraja svake izoforme i domene koje uključuje. (Preuzeto i prilagođeno prema Vieler i Sanyal 2018).

1.5. Ekspresija izoformi p53 u tumorigenezi

Protein p53 ima važnu ulogu u razvoju i progresiji tumora i njegovom odgovoru na kemoterapiju. U brojnim kliničkim ispitivanjima teško je predvidjeti klinički ishod i terapijski odgovor koji se temelji samo na mutacijskom statusu p53 (Kim i An 2016). Mutacije gena *TP53* smatrale su se uglavnom odgovornima za nastanak tumora. Međutim, rezultati istraživanja pokazuju da se tumor može pojaviti unatoč niskoj stopi mutacije *TP53*, a u mnogim takvim slučajevima uočena je značajna promjena u razini ekspresije izoformi p53 (Vieler i Sanyal 2018). Na primjer, kod tumora dojke, sa stopom mutacija od samo 25%, ekspresija izoformi p53 uvelike se mijenja. Postoje rezultati istraživanja o smanjenju ekspresije p53 i većine izoformi p53 za 60% te povećanja ekspresije $\Delta 133p53$ za 40% (Bourdon i sur. 2005). Anensen i sur. (2006) su u svojim istraživanjima dobili isti obrazac ekspresije kod akutne mijeloidne leukemije, gdje je samo 10% slučajeva imalo mutaciju *TP53*, ali su uočili veliku promjenu razine ekspresije izoformi p53. Budući da izoforme p53 moduliraju aktivnost p53 i ekspresiju gena, očekuje se da je njihova prekomjerna ekspresija ili gubitak ekspresije u tumoru povezana s tumorigenezom. $\Delta 133p53$ može stimulirati migraciju stanica, angiogenezu i time progresiju tumora reguliranjem ekspresije angiogenih gena. Stoga se smatra da $\Delta 133p53$ ima važnu biološku ulogu (Surget i sur. 2014) (Slika 7). $\Delta 133p53$ može tvoriti dimer ili tetramer s FLp53 (FLp53, engl. *full length p53*) ili drugim izoformama p53 koje imaju domenu OD (OD, engl. *oligomerization domain*) (Campbell i sur. 2018) te s TAp73 (Zorić i sur. 2013). Dokazano je da $\Delta 133p53$ mijenja selektivnost promotora i transkripcijsku aktivnost porodice p53 (uključujući izoforme p53/p63/p73) te potiče preživljenje stanica indukcijom popravka DNA, angiogenezu i regulaciju imunološkog odgovora na proliferaciju tumora (Campbell i sur. 2018). Izoforma $\Delta 133p53$ također inhibira apoptozu induciranjem ekspresije skupine gena te je povezana s proangiogenezom tumora (Bernard i sur. 2013). Osim toga, može potaknuti popravak dvolančanog loma DNA (DSB, engl. *double-strand breaks*) te odgoditi početak replikativnog starenja ili produžiti (Mondal i sur. 2013).

$\Delta 40p53$ može također oligomerizirati s FLp53 *in vivo* i time regulirati njegovu funkciju. Budući da zadržava samo TAD II, $\Delta 40p53$ je sposoban inducirati različiti skup gena koji reagiraju na p53. Snažna tendencija $\Delta 40p53$ da formira oligomere pokazuje da male količine $\Delta 40p53$ mogu imati značajan učinak na put p53 (Weinberg i sur. 2004). U biti, $\Delta 40p53$ balansira regeneraciju tkiva i supresiju tumora (Maier i sur. 2004). Terapijska strategija koja se razvija sastoji se u reaktivaciji p53 u stanicama tumora reaktiviranjem mutantnog proteina p53

ili inhibicijom represora p53, kao što je MDM2 (Surget i sur. 2013). Razumijevanje mehanizama djelovanja izoformi p53 može biti instrument za daljnje poboljšanje liječenja tumora. Do sada, većina korelacija abnormalne ekspresije izoformi p53 i razvoja tumora ovisi o slučaju (Vieler i Sanyal 2018).

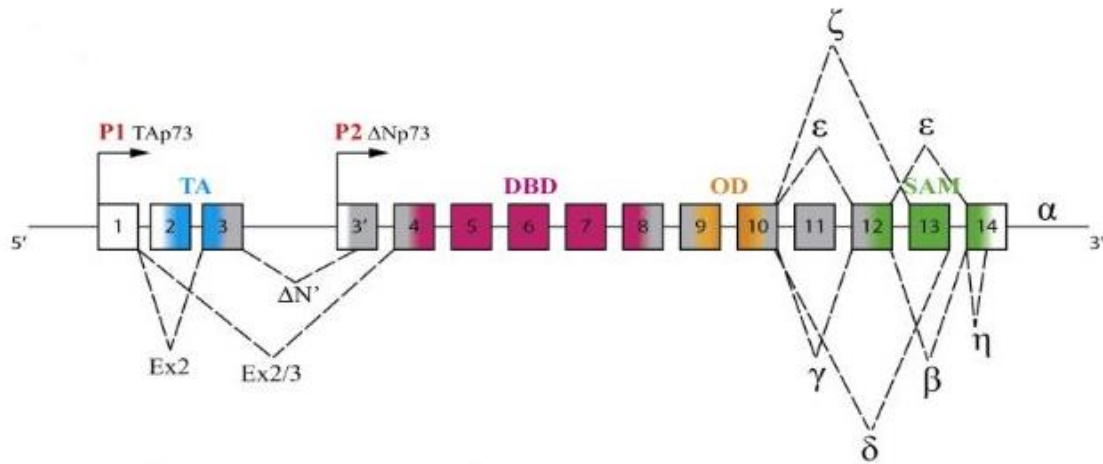


Slika 7. Izoforme p53 u tumoru i ciljana terapija. Neke izoforme p53, kao što je $\Delta 133p53\alpha$ inhibiraju antitumorsku ulogu kanonskog p53 α , dok druge pojačavaju njegovu aktivnost (Preuzeto i prilagođeno prema Surget i sur. 2014).

1.6. Protein p73 i njegove izoforme

Protein p73 rijetko je mutiran u tumorima, ali je često pojačano eksprimiran. Također ima i brojne razvojne uloge – ekspresija proteina p73 potrebna je za neurogenezu specifičnih neuronskih struktura i za normalnu fluidnu dinamiku cerebrospinalne tekućine (Moll i Slade 2004). Studije pokazuju da p73 reagira na brojne, ali ne i na sve signale kao p53. Otkriveno je da stanice koje nemaju funkcionalni p53 kada su izložene oštećenju DNA, prolaze kroz apoptozu izazvanu p73 (Slade i sur. 2010). Gen *TP73* smješten je na kraćem kraku kromosoma 1 i sastoji se od 14 eksona i jednog alternativnog eksona. Proteini p73 rijetko su mutirani ili deletirani u tumorima, ali su pojačano eksprimirani. S gena *TP73* prepisuje se puno različitih mRNA, koje su translaticirane u brojne proteine (Slika 8). Različite mRNA nastaju zbog upotrebe dva alternativna promotora, P1 u 5'UTR uzvodno od eksona 1 i P2 koji se nalazi između eksona 3 i 4 te zbog alternativnog prekradanja i N-kraja i C-kraja. Transkripcija s dva različita promotora gena *TP73* rezultira stvaranjem TAp73 i $\Delta Np73$. Prvi sadrži transaktivacijsku domenu (TA), koju kodiraju eksoni 2 i 3. Nasuprot tome, $\Delta Np73$ je kraći i ne sadrži TA-

domenu. Druga skupina skraćenih izoformi p73 nastaje alternativnim prekrajnjem N-kraja transkripta generiranog sa P1 promotora (ΔEx2p73 , $\Delta\text{Ex2/3p73}$, $\Delta\text{N}'\text{p73}$) (Vikhreva i sur. 2018).

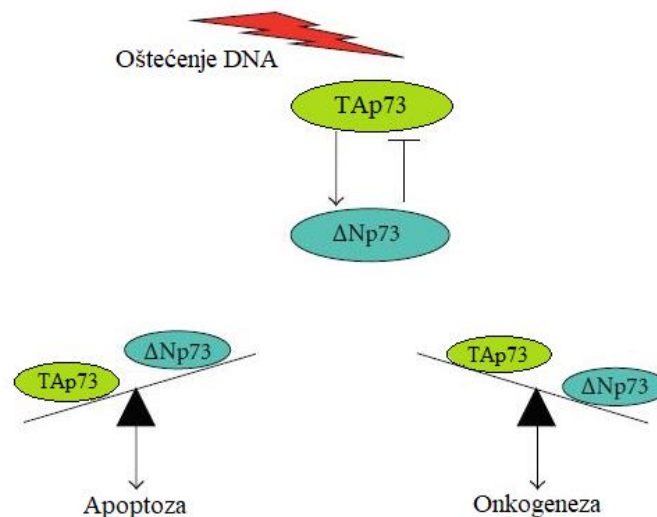


Slika 8. Strukura gena *TP73* i njegove izoforme. Strelice pokazuju mjesta početka transkripcije s oba promotora. Izoforme se mogu podijeliti na one koje posjeduju cijelovito transaktivacijsko područje (TAp73) i one kojima nedostaje dio (Ex2p73 , Ex2/3p73 , $\Delta\text{N}'\text{p73}$) ili cijelo transaktivacijsko područje (ΔNp73). Prikazana je organizacija C-kraja izoformi p73 (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η). Domene proteina p73 s pripadajućim eksonima prikazane su različitim bojama, TA (transaktivacijska domena), DBD (domena koja veže DNA), OD (oligomerizacijska domena), SAM (sterilni α -motiv) (Preuzeto i prilagođeno prema Vikhreva i sur. 2018).

1.7. Međusobne interakcije proteina p53 i p73

Ovisno o prisutnosti ili nedostatku TAD, izoforme p73 mogu djelovati kao aktivatori ili inhibitori transkripcije. Izoforme skraćene na N-kraju, ΔNp73 , kao i mutirani p53 tvore komplekse s TAp73 i p53 te se natječu za vezna mjesta na DNA zajedno s p53 odnosno TAp73. Na taj način dominantno-negativne izoforme ΔNp73 inhibiraju tumor-supresorske aktivnosti transkripcijski aktivnih izoformi TAp73 (Zaika i sur. 2002). TAp73 djeluje kao inhibitor migracije i invazije tumorskih stanica, dok ΔNp73 narušava odgovor na oštećenje DNA, podržava staničnu transformaciju, invaziju tumora i metastaziranje (Stantic i sur. 2015). Također, formiranjem heterokompleksa između izoformi p53 i TAp73 inhibira se transkripcijska aktivnost TAp73 β i apoptoze potaknute tom izoformom (Zorić i sur. 2013, Slade i sur. 2004). Kao i p53, protein p73 reagira na različite signale stresa kao što je aktivacija onkogenima ili oštećenje DNA (Zawacka-Pankau i sur. 2010). TAp73 može potaknuti transkripciju gena induciranih s p53 kao što su *p21/WAF1*, *GADD45*, *14-3-3 σ* , *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95/FAS*, *PIG3* i *p53AIP1*. Isto tako može regulirati razinu ΔNp73 izravnim

aktiviranjem transkripcije s drugog promotora (P2). p73 također može utjecati na unutarstanični smještaj proteina p53. U stanicama neuroblastoma, koje eksprimiraju divlji tip ali nefunkcionalni citoplazmatski p53, ekspresija TAp73 posredovana adenovirusom dovela je do nuklearne translokacije endogenog p53, regulacije p21 i indukcije zaustavljanja rasta stanica (Vilgelm i sur. 2008). Relativna razina ekspresije izoformi TAp73 i Δ Np73 odgovorna je za ishod ekspresije p73. U prilog ovoj hipotezi, Δ Ex2/3 izoforma je prvi put identificirana u staničnoj liniji neuroblastoma, a zatim je otkrivena i njena visoka razina u oko 50% staničnih linija tumora dojke. Relativna prekomjerna ekspresija ove izoforme uzrokuje otpornost na apoptozu induciranu kemoterapijskim lijekovima i dokazano je da Δ Ex2/3 inhibira aktivnost i p53 i TAp73 α (Domínguez i sur. 2006). Δ Np73 izoforme imaju duži poluživot nego TAp73 (Slade i sur. 2004). Prekomjerna ekspresija Δ Np73 u tumorima može biti važan mehanizam u blokiranju proapoptotskih funkcija TAp73 i p53 (Rufini i sur. 2011). U normalnim fiziološkim uvjetima, ekspresija p73 se održava na prilično niskoj razini. Indukcija i aktivacija p73 uzrokovane oštećenjem DNA regulirana je posttranslacijskim modifikacijama kao što su fosforilacija i acetilacija, koje su čvrsto povezane s interakcijama protein-protein (Ozaki i sur. 2010) (Slika 9). p53 i TAp73 mogu biti inhibirani mutiranim p53 (Napoli i Flores 2017). Liu i sur. (2004) pokazali su da Δ Np73 β ima sposobnost zaustavljanja staničnog ciklusa i apoptoze stanica. Za razliku od Δ Np73 β , Δ Np73 α je neaktivan u suzbijanju staničnog rasta.

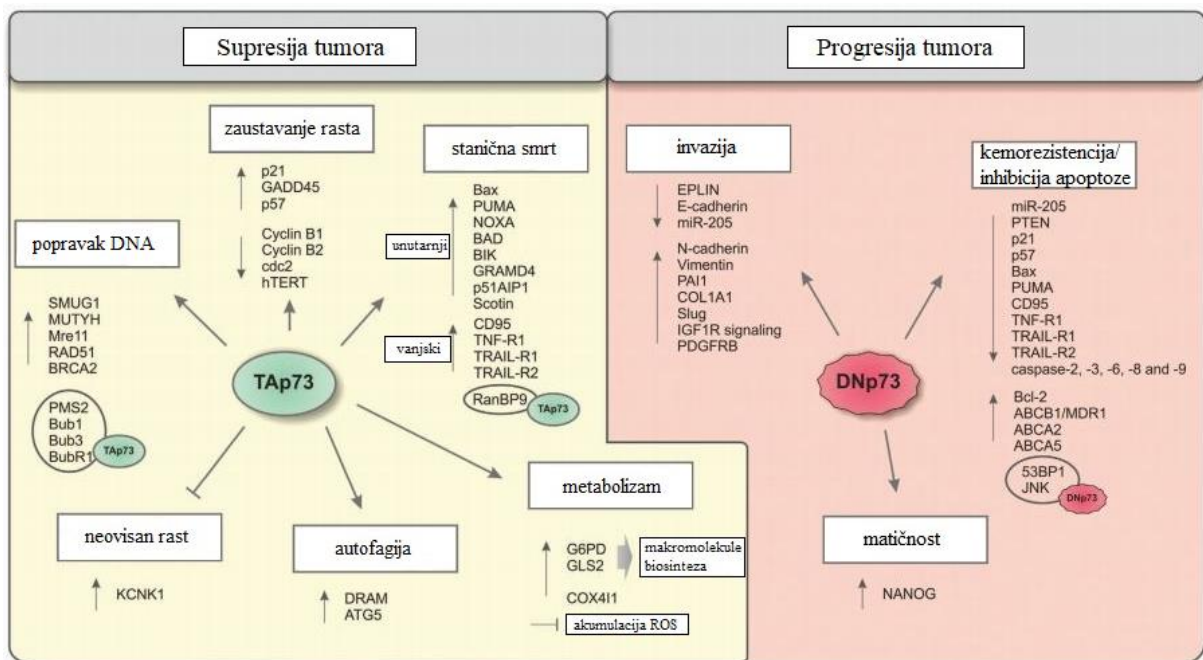


Slika 9. Dominantno negativni učinak Δ Np73 na TAp73. Kao odgovor na oštećenje DNA, TAp73 transaktivira svoj dominantno-negativni inhibitor Δ Np73. Unutarstanična ravnoteža između razine ekspresija TAp73 i Δ Np73 odlučujuća je za sudbinu stanice (Preuzeto i prilagođeno prema Ozaki i sur. 2010).

1.8. Ekspresija izoformi p73 u tumorima

Za razliku od p53, p73 je rijetko mutiran u tumorima, ali je njegova ekspresija često pojačana. Ekspresija p73 posebno je dobro proučena u tumorima dojke, gdje se pokazalo da su razine mRNA p73 povećane kod 40% bolesnika (Domínguez i sur. 2006). Povećana ekspresija izoformi p73 također je otkrivena u drugim tipovima tumora. Na primjer, u 70% tumora jajnika, ekspresija p73 se povećava na razini mRNA i proteina (Rufini i sur. 2011). Slično je pronađeno u hepatocelularnim tumorima, gdje je zabilježena povećana ekspresija proteina p73 u usporedbi s normalnim tkivom jetre (Moll i sur. 2001). Tumori s visokom ekspresijom p73 imaju tendenciju da eksprimiraju kompleksan profil do šest različitih C-terminalnih izoformi, gdje je p73 α glavni oblik, dok zdrava tkiva i tkiva tumora dojke s niskim razinama mRNA p73 isključivo eksprimiraju TAp73 α (Vikhreva i sur. 2018). Ipak, TAp73 β pokazuje najjaču proapoptotsku aktivnost (Moll i Slade 2004). Kao što je prije spomenuto, Δ Np73 djeluju kao dominantno-negativni regulatori i TAp73 i p53 (Zaika i sur. 2002). Krajnji učinak p73 izoformi u progresiji tumora pripisuje se omjeru TAp73/ Δ Np73. Izoforme TAp73 štite stanice od onkogenih promjena te imaju važnu ulogu u apoptozi. Gen *TP73* kodira izoforme TAp73 α , TAp73 β , TAp73 γ , TAp73 δ , TAp73 ϵ , TAp73 ζ i TAp73 η u normalnim stanicama. U širokom rasponu tipova tumora izoforme TAp73 su prekomjerno eksprimirane. Ekspresija TAp73 varijanti s C-krajem ne pokazuju specifičan, konzistentan obrazac. Na primjer, različiti neuroblastomi imaju kompleksne varijante C-kraja TAp73 koje nisu u korelaciji s tipičnim kliničkim i biološkim karakteristikama. TAp73 α i TAp73 β su eksprimirane u diferenciranom neuroblastomu, dok su TAp73 γ , TAp73 δ , TAp73 ϵ i TAp73 η eksprimirane u nediferenciranom neuroblastomu. Svaka izoforma TAp73 aktivira različite ciljne gene. Izoforme TAp73 α i TAp73 β nemaju potpuno iste učinke na iste ciljne gene. Na primjer, za razliku od TAp73 α , TAp73 β inducira protein koji veže IGF (IGFBP3, engl. *IGF-binding protein 3*), koji izravno inhibira rast i čini stanice osjetljivim na apoptozu. Geni koje regulira TAp73 β uključeni su u metastaziranje, kao što je fokalna adhezija, interakcija ECM-receptora i regulacija aktinskog citoskeleta (Logotheti i sur. 2013). Ekspresija izoformi p73 sa skraćenim N-krajem značajno je povećana u mnogim ljudskim tumorskim staničnim linijama. Stanične linije koje pokazuju visoku razinu p73 također eksprimiraju velike količine svih izoformi Δ Np73. Zbog toga se smatra da Δ Np73 ima potencijalnu onkogenu funkciju, jer prisilna ekspresija Δ Np73 u staničnim linijama tumora inhibira tumor-supresorsku aktivnost p53 i TAp73. Visoka ekspresija izoformi Δ Np73 u tumorima, osobito naprednog stadija, naglašava njihovu uključenost u tumorigenezi (Slika 10). U većini tumora izoforme Δ Np73 više su eksprimirane

od TAp73 što rezultira povećanim omjerom $\Delta Np73/TAp73$ (Stiewe i sur. 2004). Analiza razine ekspresije pokazala je da izoforme izravno koreliraju jedna s drugom te da su oba promotora regulirana istim poticajem. Međutim, čak i ako su razine transkripta TAp73 i $\Delta Np73$ podjednako prisutne, povećana je stabilnost $\Delta Np73$ proteina što može rezultirati višom unutarstaničnom koncentracijom onkogenih varijanti p73 (Grob i sur. 2001). Inače, nije poznato koliko je potrebno da $\Delta Np73$ nadvlada tumor-supresorsku funkciju TAp73. Moguće je da prisutnost izoformi $\Delta Np73$, čak i na niskim razinama, potpuno potisnu aktivnost TAp73, uz posljedično uklanjanje nužne protu-tumorske funkcije TAp73 (Buhlmann i Pützer 2008).



Slika 10. Stanični procesi regulirani izoformama TAp73 i $\Delta Np73$ određuju ishod tumora (Preuzeto i prilagođeno prema Engelmann i sur. 2015).

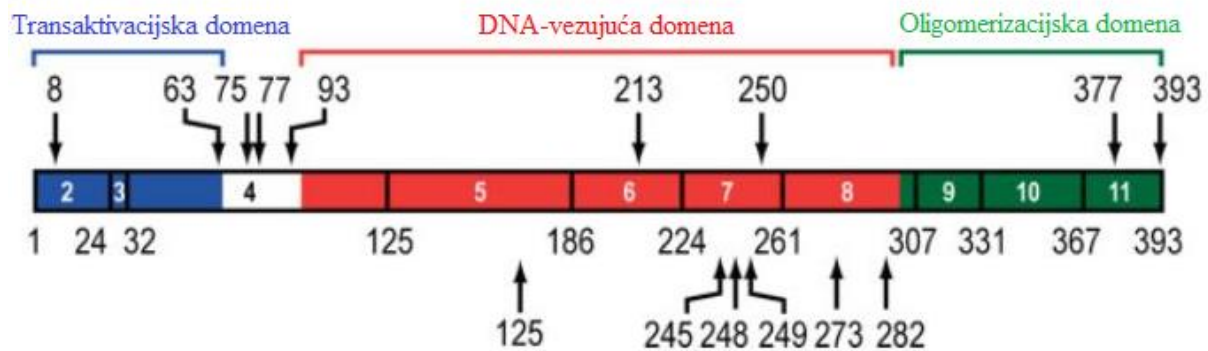
1.9. Sarkomi mekih tkiva

Sarkomi mekih tkiva (STS, engl. *soft tissue sarcoma*) heterogena su skupina rijetkih tumora mezenhinskog porijekla. Postoji više od 50 različitih podtipova koji se razlikuju u molekularnim, histološkim i kliničkim karakteristikama (Seetharam i sur. 2018). Najčešći podtipovi su angiosarkom, liposarkom, leiomiosarkom, sinovijalni sarkom, rabdomiosarkom i Ewingov sarkom (Hoang i sur. 2018). Većina sarkoma mekih tkiva nema jasan identifikacijski uzrok nastajanja, ali veću genetsku predispoziciju za nastanak sarkoma imaju bolesnici s neurofibromatozom, obiteljskom adenomatoznom polipozom, Li-Fraumeni sindromom i retinoblastonom. Na temelju genetskih aberacija, STS se može podijeliti u dvije glavne skupine:

i) sa specifičnim genetskim promjenama koje uključuju varijabilnu preraspodjelu gena, fuziju gena, recipročne translokacije i specifične mutacije kao što su u genima *KIT* ili *PDGFRA* u gastrointestinalnom stromalnom tumoru; ii) većina sarkoma ima nespecifične genetske promjene, koje su često složene i višestruke te predstavljaju varijabilne kromosomske dobitke ili gubitke. Mutacije gena *TP53* povezane su sa sindromom Li-Fraumeni. Nadalje, primijećeno je da su različiti geni koji moduliraju aktivnost p53, kao što su *CDKN2A* i *MDM2* promijenjeni u sarkomima (Brennan i sur. 2013). Recipročne kromosomske translokacije su karakteristične za sinovijalni sarkom, mikroidni liposarkom i alveolarni rabdomiosarkom. Fuzijski geni koji proizlaze iz tih translokacija često kodiraju receptore faktora rasta (Engellau 2004). Liječenje sarkoma mekih tkiva uključuje operaciju, zračenje, kemoterapiju i ciljanu terapiju. Za liječenje uznapređovalog STS koriste se kemoterapijski lijekovi doksorubicin, ifosfamid, gemcitabin, pazopanib, trabektedin, docetaksel (Seetharam i sur. 2018).

1.10. Mutacije *TP53* u sarkomima mekih tkiva

Mutacije u genu *TP53* najčešće su genetske promjene u STS sa stopom mutacija od 12% do 21% (Von Mehren i sur. 2016). Klonalna ekspanzija mutiranih stanica daje značajne metastatske prednosti uključujući gubitak kontrole staničnog ciklusa, pojačanu angiogenezu, invazivnost i kemorezistentnost. Das i sur. (2007) pokazali su da visoka stopa mutacija eksona 4 sugerira da to može biti područje sklono mutacijama u STS, osobito u sinovijalnom sarkomu (Slika 11). Yin i sur. (2011) pokazali su da je učestalost mutacija *TP53* visoka u staničnim linijama rabdomiosarkoma te da je učestalost mutacija *TP53* značajno viša u slučajevima nespecifičnih recipročnih translokacija povezanim sa sarkomima mekih tkiva nego u slučajevima sa specifičnom recipročnom translokacijom. To sugerira da p53 može funkcionirati kao potencijalni molekularni marker za razlikovanje dviju skupina STS. Štoviše, prisutnost mutacija *TP53* u nastanku tumora može imati glavnu ulogu u nespecifičnim recipročnim translokacijama povezanim sa sarkomom mekih tkiva.



Slika 11. Spektar mutacija *TP53* u sarkomu mekih tkiva. Strelice predstavljaju mjesta mutacije u *TP53*, a brojevi granice kodona za eksone (Preuzeto i prilagođeno prema Das i sur. 2007).

1.11. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti gensku i proteinsku ekspresiju izoformi p53 i p73 u panelu staničnih linija sarkoma mekih tkiva čovjeka. Pretpostavljam da bi izoforme p53, kao i izoforme p73, mogle sudjelovati u inaktivaciji p53, u inicijaciji tumora i njegovoj progresiji, stoga je važno odrediti njihov ekspresijski profil. Za detekciju proteina koristila sam metodu Western blota, a za gensku ekspresiju izoformi p53 i p73 metodu kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR).

2. Materijali i metode

2.1. Materijali

2.1.1. Materijali korišteni u staničnoj kulturi

Stanične linije sarkoma mekih tkiva čovjeka koje sam koristila su: HT-1080 (fibrosarkom), RD (rabdomiosarkom), A204 (rabdomiosarkom), SW872 (liposarkom) i SW982 (sinovijalni sarkom). Stanične linije opisane su u tablici 1. Stanice su uzgajane u tekućim hranjivim podlogama (Tablica 2) u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37 °C i 5% CO₂.

Tablica 1. Popis staničnih linija

Stanična linija	ATCC	Izvor tumora	Status gena <i>TP53</i>
HT-1080	CCL-121	Primarni fibrosarkom	Divlji tip
RD	CCL-136	Primarni rabdomiosarkom	c.742C>T (p.Arg248Trp)
A204	HTB-82	Primarni rabdomiosarkom	c.639A>G (p.Arg213Arg)
SW872	HTB-92	Primarni liposarkom	c.752T>A (p.Ile251Asn)
SW982	HTB-93	Primarni sinovijalni sarkom	Divlji tip

Materijali koje sam koristila u radu sa staničnim kulturama:

- PBS (engl. *phosphate buffered saline*), pH=7,4 (137 mM NaCl (Kemika, Hrvatska), 2,7 mM KCl (Kemika, Hrvatska), 1,4 mM KH₂PO₄ (Kemika, Hrvatska), 4,3 mM Na₂HPO₄ × 7 H₂O (Kemika, Hrvatska))
- tripsin (Sigma Aldrich, SAD)

Tablica 2. Sastav kompletiranih tekućih hranjivih podloga za rast pojedinih staničnih linija

Sastav kompletiranih tekućih hranjivih podloga	Stanične linije
DMEM (engl. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> , Thermo Fisher Scientific, SAD), 10% seruma telećeg fetusa, FBS (engl. <i>fetal bovine serum</i> , Sigma Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD), 100 mM natrijev piruvat (Thermo Fisher Scientific, SAD), 100 U/mL penicilin (Thermo Fisher Scientific, SAD), 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific, SAD)	HT-1080 A204 RD
L15 (engl. <i>Leibovitz's medium</i> , Sigma Aldrich, SAD) 10% FBS (Sigma Aldrich, SAD), 2 mM L-glutamin (Sigma Aldrich, SAD), 100 U/mL penicilin (Thermo Fisher Scientific, SAD), 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific, SAD)	SW872 SW982

2.1.2. Otopine i puferi

- fosfatni pufer za izolaciju proteina (DPBS, engl. *Dulbecco's phosphate buffered saline*) (Sigma Aldrich, SAD)
- medij za zamrzavanje (10mL, 45% FBS-a, 45% hranjive podloge i 10 % DMSO)
- 30%-tna matična otopina akrilamida i bisakrilamida (Sigma Aldrich, SAD)
- pufer za donji gel poliakrilamida/gel za razdvajanje (pH = 8,8; 1,5 M Tris, deH₂O)
- pufer za gornji gel poliakrilamida/gel za sabijanje (pH = 6,8; 1 M Tris, deH₂O)
- 10%-tni SDS (Sigma Aldrich, SAD)
- 10%-tni amonijev persulfat (Sigma Aldrich, SAD)
- izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamin) (Sigma Aldrich, SAD)
- pufer za elektroforezu (10 ×) (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0,1% SDS)

- pufer za nanošenje uzorka (4 ×) (LB, engl. *Laemmli buffer*) (2 mL 1 M Tris (pH 6,8), 4 mL glicerol (Kemika, Hrvatska), 4 mL 1 M ditioneitol (Sigma Aldrich, SAD) , 8 mL 10% SDS, 20 mg bromfenolno plavilo (Sigma Aldrich, SAD))
- pufer za prijenos (10 ×) (TB, engl. *transfer buffer*) (184 mM Tris, 140 mM Tris, 20% metanol)
- pufer TBST (engl. *tris buffer saline tween*) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)
- otopina za blokiranje membrane (5% obrano mlijeko u prahu u puferu TBST)
- otopina za bojanje membrana Ponceau S (0,5% Ponceau S (Sigma-Aldrich, SAD), 10% ledena octena kiselina)
- Takyon Low Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgija)
- GoTaq Colorless Master Mix (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- DNaza (Qiagen, Njemačka)
- inhibitori proteaza (Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Švicarska)

2.1.4. Komercijalni kompleti

- komplet za određivanje koncentracije proteina Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- komplet za detekciju proteina kemiluminiscencijom Wester Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer, Nizozemska)
- komplet za izolaciju PureLink® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- komplet za reverznu transkripciju High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)

- komplet otopine DNaze Rnase Free DNase Set (Qiagen, SAD)

2.1.5. Ostali materijali

- nitrocelulozna membrana za prijenos proteina, promjera 0,2 μm (Millipore, SAD)
- standard za određivanje molekularne mase proteina, Precision Plus Protein Standards Dual Color, raspona 10-250 kDa (BioRad, SAD)
- sterilne plastične boce T-75 (BD Falcon, SAD)
- pločica sa 96 bunarića (BD Falcon, SAD)
- krioepuvete za zamrzavanje stanica (Greiner Bio-One, Austrija)

2.1.6. Uređaji

- kabinet za rad u sterilnim uvjetima (Iskra, Slovenija)
- inkubator za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija)
- zibalica Gyro Rocker SSL3 (Stuart, Velika Britanija)
- magnetska miješalica MSH Basic (Ika, Njemačka)
- termoblok Termomixer Comfort (Eppendorf, Njemačka)
- sustav za elektroforezu Mini-Protean II (BioRad, SAD)
- centrifuga, Harrier 18/80 (MSE, Velika Britanija)
- centrifuga 51445 R (Eppendorf, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica (Multiscan MS Labsystems, Finska)
- tresilica za mikrotitarske pločice 715 (Asal, Italija)
- uređaj za oslikavanje Alliance 4.7 (UVItec, Velika Britanija)
- PCR 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- CFX96 Real-Time PCR (BioRad, SAD)

- Applied Biosystems Steo One Plus (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Nanodrop NP60 (Implen, Njemačka)

2.2. Metode

2.2.1. Odmrzavanje stanica

Zamrznute stanice u krioeproveta čuvaju se u spremniku s tekućim dušikom pri -196 °C. Izvadila sam krioeprove sa stanicama i držala ih u vodenoj kupelji 5 min pri 37 °C dok se sadržaj nije otopio do pola. U sterilne staklene epruvete dodala sam 3 mL kompletirane hranjive podloge DMEM za stanice HT-1080, A204 i RD, a za stanice SW872 i SW982 kompletirane hranjive podloge L-15. U sterilnim uvjetima sadržaj sam prebacila u sterilne staklene epruvete i centrifugirala 5 min pri 800 g, pri +4 °C kako bi se uklonio medij za zamrzavanje. Supernatant sam odlila, a stanični talog resuspendirala u 10 mL odgovarajuće kompletirane hranjive podloge i stavila u sterilne plastične boce T-75 ili Petrijeve zdjelice za uzgoj staničnih kultura promjera 10 cm (SW872, SW982, RD, A204 i HT-1080).

2.2.2. Održavanje stanica u kulturi

Stanice korištenih staničnih linija su adherentne (rastu pričvršćene za podlogu). Uzgajane su u sterilnim plastičnim bocama T-75 i Petrijevim zdjelicama pri 37 °C i 5% CO₂ u atmosferi zasićenoj vlagom. Svaka 3 dana, kada su stanice potrošile hranjive tvari iz podloge te postale 90-100% konfluentne, presađivala sam ih. Prije početka rada sa stanicama, potrebne kemikalije (kompletirana hranjiva podloga, tripsin i PBS) zagrijala sam u vodenoj kupelji pri 37 °C. Sva rukovanja sa stanicama izvodila sam u sterilnom okruženju, u laminaru s okomitim strujanjem zraka. Nakon što sam pod mikroskopom provjerila konfluentnost stanica, u laminaru sam sa sterilnom staklenom pipetom uklonila hranjivu podlogu. Zatim sam stanice isprala s 5 mL sterilnog fosfatnog pufera kojeg sam nakon toga uklonila te ih inkubirala s 2 mL tripsina kako bi se odvojile od podloge, jer enzim tripsin cijepa proteinske veze među stanicama, što se može provjeriti pod mikroskopom (stanice se zaokruže i počinju plutati). Tripsin sam inaktivirala dodavanjem 6-7 mL odgovarajuće kompletirane hranjive podloge. Temeljitim resuspendiranjem i ispiranjem stanica s podloge omogućeno je homogeno raspoređivanje stanica u mediju. Od dobivene suspenzije stanica ostavila sam nekoliko kapi u sterilnim

plastičnim bocama T-75 ili Petrijevim zdjelicama i dodala 10 mL kompletirane hranjive podloge DMEM ili L-15, ovisno o staničnoj liniji.

2.2.3. Zamrzavanje stanica

Za dugotrajno pohranjivanje stanice je najbolje zamrznuti. Bitno je zamrzavati stanice kada su optimalne gustoće (80-90% konfluentne). Stanicama sam uklonila kompletiranu hranjivu podlogu i isprala s 5 mL sterilnog PBS-a kojeg sam nakon toga uklonila. Zatim sam stanice inkubirala s 2 mL tripsina kako bi se odvojile od podloge te ih stavila u sterilne staklene epruvete i resuspendirala u 5 mL hranjive podloge. Nakon toga, staklene epruvete sam centrifugirala tijekom 5 min pri 800 g u centrifugi ohlađenoj na +4 °C. Nakon centrifugiranja odlila sam supernatant, a talog resuspendirala u 1mL hladnog medija za zamrzavanje, prebacila u krioeprevete i pohranila na -80 °C. Za dulje skladištenje takve krioeprevete se pohranjuju u tekućem dušiku pri -196 °C.

2.2.4. Analiza genske ekspresije

2.2.4.1. Izolacija ukupne RNA i reverzna transkripcija

Za izolaciju ukupne RNA iz staničnih linija koristila sam komplet za izolaciju PureLink® RNA Mini Kit, sukladno uputama proizvođača uz tretman DNazom. Stanice sam prvo lizirala dodatkom 600 µL pufera za lizu (engl. *Lysis Buffer*). Lizat sam 5-10 puta provlačila kroz štrcaljku s integriranom iglom. Zatim sam dodala 600 µL 70% etanola na homogenizirani lizat kako bi se postigli idealni uvjeti vezanja i nanijela 700 µL na kolonu. Nakon centrifugiranja 15 s pri 12000 g filtrat sam uklonila i na kolonu dodala 80 µL otopine DNaze (10 µL DNaze u 70 µL pufera RDD (engl. *RDD buffer*)) te je razgradnja vezane DNA provedena tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi. Kolone sam potom isprala tri puta s 700 µL pufera za ispiranje 1 (engl. *Wash Buffer I*) te dva puta puferom za ispiranje 2 (engl. *Wash Buffer II*). Nakon dodatka svakog pojedinog pufera uslijedilo je centrifugiranje 15 s pri 12000 g i uklanjanje filtrata. Ukupnu RNA s kolone eluirala sam s 50 µL vode počišćene od RNaza (engl. *RNase-free water*) uz centrifugiranje 2 min pri 12000 g. Nakon provedene izolacije mjerila sam koncentraciju RNA spektrometrijski na uređaju Nanodrop NP60. Koristeći komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit metodom reverzne transkripcije prepisala sam RNA u cDNA. Reakcija reverzne transkripcije ukupnog volumena 20 µL sastoji se od 10 µL 2 × reakcijske smjese a

drugih 10 μL čini 2 μg RNA nadopunjene reH₂O do konačnog volumena od 10 μL . Reakcija se odvijala u uređaju PCR 2720 Thermal Cycler u uvjetima: 10 min pri 25 °C, 120 min pri 37 °C, 5 min pri 85 °C, ∞ pri 4 °C. Zatim sam cDNA razrijedila s 60 μL reH₂O do konačne koncentracije 25 ng/ μL .

Tablica 3. Sastav 2 \times reakcijske smjese za reverznu transkripciju.

Reagens	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji (10 μL)
10 \times RT pufer	10 \times	1 \times	2,0 μL
25 \times dNTP	100 mM	10 mM	0,8 μL
10 \times Nasumične početnice	10 \times	1 \times	2,0 μL
Reverzna transkriptaza	50 U/ μL	2,5 U/ μL	1,0 μL
Inhibitor RNaze	20 U/ μL	1 U/ μL	1,0 μL
reH ₂ O			3,2 μL

2.2.4.2. Kvantitativni PCR metodom *SYBR Green-a*

Ekspresiju gena *TP53* određivala sam metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom, qPCR (engl. *quantitative polymerase chain reaction*) na kalupu cDNA. Metoda se temelji na mjerenju fluorescencijskog signala tijekom amplifikacije DNA u eksponencijalnoj fazi reakcije PCR. Zbog složene organizacije gena *TP53* koristila sam prilagođenu metodu ugniježdenog PCR-a (engl. *nested PCR*) koja uključuje dvije uzastopne reakcije PCR. Prvu, pre-amplifikacijsku reakciju kojom sam umnožila određeni set „dugih“ i „kratkih“ izoformi te zatim reakciju qPCR, kojom sam odredila razinu ekspresije specifične izoforme. Kao referentnu vrijednost koristila sam ukupnu ekspresiju gena *TP53*. Za „duge“ izoforme odnosno varijante mRNA u pre-amplifikacijskoj reakciji koristila sam početnice P1 i P2 (Tablica 4). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedio je qPCR za p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ (Slika 12). Za „kratke“ izoforme odnosno varijante mRNA u pre-amplifikacijskoj reakciji koristila sam početnice P3 i P2 (Tablica 4). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedio je qPCR za Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ (Slika 12). U reakciji pre-amplifikacije dugih izoformi koristila sam 25 ng DNA, dok u reakciji pre-amplifikacije kratkih izoformi koristila sam 50 ng DNA. Prije slaganja PCR reakcije početnice sam zagrijala tijekom 5 min pri 90 °C da se uklone međusobno sparene početnice.

Tablica 4. Popis početnica za duge i kratke izoforme gena *TP53*. Početnica F je uzvodna početnica, a početnica R je nizvodna početnica.

Izoforma	Početnica	Slijed nukleotida u smjeru 5' - 3'
„duge“	Početnica F P1	GTCACTGCCATGGAGGAGCCGCA
	Početnica R P2	CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG
„kratke“	Početnica F P3	TTCCAGTTGCTTTATCTGTTCACCTGT
	Početnica R P2	CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG

Tablica 5. Sastav pre-amplifikacijske reakcije.

Reagens	Preamplifikacija dugih izoformi		Preamplifikacija kratkih izoformi	
	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji (25 µL)	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji (25 µL)
1 × Go-Taq mix	1 ×	12,5 µL	1 ×	12,5 µL
Početnica F (P1 i P3)	0,4 mM	1 µL	0,4 mM	1,0 µL
Početnica R (P2)	0,4 mM	1 µL	0,4 mM	1,0 µL
cDNA	1 ng/µL	1 µL	2 ng/µL	2,0 µL
reH ₂ O		9,5 µL		8,5 µL

Reakcija pre-amplifikacije odvijala se u uređaju PCR 2720 Thermal Cycler u uvjetima: 3 min pri 95 °C, zatim 35 ciklusa (30 s pri 94 °C, 40 s pri 60 °C, 90 s pri 72 °C) i 7 min pri 72 °C. Nakon završetka reakcije, pre-amplificirane duge izoforme razrijedila sam 400 puta, a kratke 200 puta. Zatim je slijedila reakcija qPCR metodom *SYBR Green-a*. Reakcije qPCR izvodila sam u duplikatima uz negativnu kontrolu bez cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju CFX96 Real-Time PCR u uvjetima: 3 min pri 95 °C zatim 40 ciklusa (15 s pri 95 °C, 20 s pri 63 °C, 10 s pri 72 °C) te reakcija taljenja u rasponu od 72 °C do 95 °C s porastom od 0,5 °C svakih 5 s.

Tablica 6. Popis početnica za reakciju qPCR.

Izoforma	Početnica	Slijed nukleotida u smjeru 5' - 3'
p53 α	p53 F	AGACCTATGGAAACTACTTCCT
	p53 α R	CTCACGCCCACGGATCTGA
p53 β	p53 F	AGACCTATGGAAACTACTTCCT
	p53 β R	AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT
p53 γ	p53 F	AGACCTATGGAAACTACTTCCT
	p53 γ R	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
Δ 40p53 α	Δ 40p53 F	GATCCATTGGAAGGGCAGGCC
	Δ 40p53 α R	CTCACGCCCACGGATCTGA
Δ 40p53 β	Δ 40p53 F	GATCCATTGGAAGGGCAGGCC
	Δ 40p53 β R	AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT
Δ 40p53 γ	Δ 40p53 F	GATCCATTGGAAGGGCAGGCC
	Δ 40p53 γ R	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
Δ 133p53 α	Δ 133p53 F	ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG
	Δ 133p53 α R	CTCACGCCCACGGATCTGA
Δ 133p53 β	Δ 133p53 F	ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG
	Δ 133p53 β R	AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT
Δ 133p53 γ	Δ 133p53 F	ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG
	Δ 133p53 γ R	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
p53 all	p53 all F	CCATCTACAAGCAGTCACAGCA
	p53 all R	TTCTTGCGGAGATTCTCTTCCT



Slika 12. Položaj početnica u ugniježđenom qPCR-u za određivanje ekspresije izoformi gena *TP53*. Za „duge“ izoforme u pre-amplifikacijskoj reakciji koristila sam početnice P1 i P2 (označene crvenom bojom). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedio je qPCR za izoforme p53α, p53β, p53γ, Δ40p53α, Δ40p53β, Δ40p53γ. Za „kratke“ izoforme u pre-amplifikacijskoj reakciji koristila sam početnice P3 i P2 (označene crvenom bojom). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedio je qPCR za Δ133p53α, Δ133p53β, Δ133p53γ.

Tablica 7. Sastav reakcije qPCR. Početnica F i R su kombinirane prema tablici 6.

Reagens	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji (10 μL)
2 × Takyon Low Rox SYBR Master Mix dTTP Blue	1 ×	5,0 μL
Početnica F	0,4 mM	0,4 μL
Početnica R	0,4 mM	0,4 μL
DNA		1,0 μL
reH ₂ O		3,2 μL

2.2.4.3. qPCR s hidrolizirajućim sondama *TaqMan*

Za detekciju izoformi gena *TP73* koristila sam sonde obilježene fluorescentnom bojom. Kao referentni gen koristila sam protein koji veže sekvencu TATA (*TBP*, engl. *TATA-Box Binding Protein*). Reakcije qPCR izvodila sam u duplikatima uz dodatnu negativnu kontrolu bez cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju Applied Biosystems Step One Plus u uvjetima: 10 min pri 95 °C zatim 40 ciklusa (15 s pri 95 °C, 1 min pri 60 °C u kojem se mjerila količina fluorescencije).

Tablica 8. Popis početnica i sondi.

Naziv	Slijed nukleotida u smjeru 5' - 3' sondi obilježenih fluorescentnom bojom	Početnica	Slijed nukleotida u smjeru 5' - 3'
TBP	TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGA	F	CACGAACCACGGCACTGATT
		R	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC
TAp73	CACCTACTTCGACCTTCCCCAGT	F	CCTCTGGAGCTCTCTGGAACC
		R	TGGGCCATGACAGATGTAGTCA
Δ Np73	TGACCCCGCACGGCACCTC	F	GCGCCTACCATGCTGTACGT
		R	AGATTGAACTGGGCCGTGG

Tablica 9. Sastav qPCR reakcije.

Reagens	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji
1 × TaqMan Gene Expression Master Mix	1 ×	12,5 μL
Početnica F	0,9 mM	2,25 μL
Početnica R	0,9 mM	2,25 μL
Sonda	0,25 mM	0,625 μL
cDNA	5 ng/μL	5,0 μL
reH ₂ O		2,375 μL

2.2.4.4. Obrada podataka

Ekspresija izoformi gena *TP53* i *TP73* izražena je kao promjena ekspresije pojedine izoforme u odnosu na referentni gen. Eksponencijalno povećavanje produkata reakcije svakim novim ciklusom pratili smo interkalacijom fluorescentne boje *SYBR Green* unutar novonastalih lanaca DNA ili hidrolizirajućih sonda *TaqMan* obilježenih fluorescencijskom bojom. Ciklus u

kojem je količina DNA bila dovoljna da fluorescencija poraste iznad praga detekcije zove se Ct vrijednost. Sve Ct vrijednosti su normalizirane prema vrijednosti referentnog gena, čija uloga je da ispravi razlike u početnoj koncentraciji uzoraka. Ekspresija izoformi gena *TP53* normalizirana je prema ukupnoj ekspresiji svih izoformi gena *TP53*, dok je ekspresija izoformi gena *TP73* normalizirana prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Ekspresija izoformi gena *TP53* i *TP73* izražena je kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen te se računa prema formuli $2^{-\Delta Ct}$, gdje je ΔCt razlika u ekspresiji ($Ct_{(ciljni\ gen)} - Ct_{(referentni\ gen)}$) (Livak i Schmittgen 2001).

2.2.5. Analiza ekspresije proteina metodom Western blota

2.2.5.1. Sakupljanje stanica za izolaciju proteina

Nakon 3 dana od nasađivanja stanica, pod mikroskopom provjerila sam konfluentnost stanica koja mora biti 90%. Sve daljnje korake radila sam na ledu kako bi se smanjila mogućnost degradacije proteina. Uklonila sam hranjivu podlogu i dodala 120 μ L PBS-a koji ne sadrži $CaCl_2$ i $MgCl_2$ u koji sam prethodno dodala inhibitore proteaza. Plastičnom strugalicom (engl. *policeman*) odvojila sam stanice s podloge. Suspenziju stanica dobro sam resuspendirala i prebacila u mikroeprovete od 1,5 mL. Zatim sam centrifugirala 5 min pri 800 g, pri +4 °C. Supernatant sam odlila, a talog koristila za izolaciju proteina.

2.2.5.2. Izolacija proteina za analizu Western blotom

Za izdvajanje proteina koristili sam metodu sonifikacije kojom se pomoću ultrazvučnih valova visoke frekvencije narušava integritet staničnih membrana i otpušta stanični sadržaj. Sve daljnje korake radila sam na ledu. Na taloge sakupljenih stanica dodala sam 100 μ L PBS-a s inhibitorima proteaza. Taloge stanica sam resuspendirala te sonicirala 15 s pri amplitudi 80, postupak sam ponovila dva puta s razmakom od 15 s.

2.2.5.3. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA

Određivanje koncentracije proteina provela sam uz upotrebu komercijalno dostupnog kompleta Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Metoda se temelji na redukciji Cu^{2+} u Cu^+ izazvanoj proteinima te kompleksiranju nastalog Cu^+ s dvije molekule bicinkonične kiseline (BCA, engl. *bicinchoninic acid*) u ljubičasto obojeni produkt čija se koncentracija određuje spektrometrijski

pri 570 nm. Uzorke sam držala na ledu zajedno sa standardima albumina iz govodeg seruma, BSA (engl. *bovine serum albumine*) poznatih koncentracija koje sam koristila za izradu baždarne krivulje. Uz pomoć baždarne krivulje i jednadžbe pravca izračunala sam koncentracije proteina. U mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića nanijela sam 20 μL standarda BSA u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 $\mu\text{g/mL}$, 20 μL reH₂O (negativna kontrola) te 20 μL razrijeđenog uzorka (2 μL uzorka u 18 μL reH₂O). Sve sam nanosila u duplikatima. U svaki bunarić stavila sam 200 μL reagensa za određivanje koncentracije BCA Protein Assay Kit, kojeg sam pripremila miješanjem otopina A i B u omjeru 50:1. Zatim sam pločicu inkubirala 30 minuta pri 37 °C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, pločicu sam ohladila na sobnu temperaturu i očitala apsorbanciju pri 570 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Na temelju očitanih apsorbancija standardnih otopina poznate koncentracije izradila sam baždarnu krivulju, pomoću koje sam izračunala koncentraciju proteina u uzorcima.

2.2.5.4. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida

SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacryl gel electrophoresis*) ili natrij dodecil sulfat-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu je metoda razdvajanja proteina na temelju molekulske mase. SDS (engl. *sodium dodecyl sulphate*) se hidrofobno veže za proteine dajući im ujednačen negativan naboj po cijeloj dužini molekule i sprječava ponovno smatanje u trodimenzionalnu strukturu. Proteini putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi razdvajajući se isključivo prema njihovoj veličini te veličini pora u gelu time se izbjegava utjecaj naboja i oblika molekule. Koristila sam diskontinuiranu SDS-PAGE, za koju sam pripremila dva gela, gornji (gel za sabijanje) i donji (gel za razdvajanje). Gornji, 5%-tni gel za sabijanje i donji, 10%-tni gel za razdvajanje međusobno se razlikuju u sastavu i pH (Tablica 2). Gel za sabijanje je rjeđi i manjeg pH (pH=6,8) te služi za sabijanje uzoraka, a gel za razdvajanje je gušći i većeg pH (pH=8,8) i služi za razdvajanje proteina na temelju razlika u molekulskim masama. Tijek elektroforeze pratila sam pomoću proteinskog markera Precision Plus Protein Standards Dual Color. β -aktin koristila sam kao kontrolu nanošenja jednakih količina uzoraka na gel.

Tablica 10. Sastav gelova za razdvajanje i sabijanje.

Reagens	Gel za sabijanje (5%)	Gel za razdvajanje (10%)
reH ₂ O	2,7 mL	4,0 mL
Otopina akrilamida i bisakrilamida (30%)	0,67 mL	3,3 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	2,5 mL
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5 mL	-
10%-tni SDS	0,4 mL	0,1 mL
10%-tni APS	0,4 mL	0,1 mL
TEMED	0,004 mL	0,004 mL

Nakon što sam pripremila gel za sabijanje i razdvajanje sastavila sam aparaturu koristeći stakalca za gel elektroforezu s razmaknicom od 1,5 mm te ih postavila na nosače. Između njih sam prvo ulila gel za razdvajanje te nakon njegove polimerizacije ulila gel za sabijanje. 15 µg proteina pomiješala sam s puferom za nanošenje uzoraka (4 × LB). Uzorke sam potom grijala tijekom 5 min pri 96 °C kako bi se proteini potpuno denaturirali te nanijela u svaku jažicu. Koristila sam uređaj za elektroforezu Mini-Protean II. Elektroforeza se odvijala u puferu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 90 V dok su uzorci putovali gelom za sabijanje, a pri 110 V dok su uzorci putovali gelom za razdvajanje.

2.2.5.5. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu

Nakon završene elektroforeze, odrezala sam gel za sabijanje i složila kazetu za prijenos proteina. Na dio kazete koji je bliži katodi postavila sam spužvicu, dva filter papira, gel za razdvajanje koji sadrži proteine, nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm, dva filter papira i spužvicu te sam zatvorila kazetu za prijenos pazeći pritom da nema mjehurića ni u jednom sloju. Prijenos se odvijao u puferu za prijenos tijekom 90 min pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA u uređaju Mini-Protean II.

2.2.5.6. Bojanje i blokiranje nitrocelulozne membrane

Nakon što je prijenos proteina završio, inkubirala sam membranu u otopini za bojanje Ponceau S. Membranu sam stavila u kadicu na zibalicu i ispirala tri puta po 10 minuta u puferu TBST. Nakon ispiranja, membranu sam blokirala u otopini za blokiranje tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi uz zibanje kako bi se priječila nespecifična vezanja protutijela.

2.2.5.7. Analiza proteina metodom Western blota

Nakon blokiranja membranu sam inkubirala u primarnom protutijelu (Tablica 3). Za detekciju izoformi proteina p53 koristila sam slijedeća primarna protutijela mišje protu-p53 α (421) koje prepoznaje izoforme p53 α , Δ 40p53 α , Δ 133p53 α i Δ 160p53 α ; ovčje protu-p53 β prepoznaje izoforme p53 β , Δ 40p53 β , Δ 133p53 β , Δ 160p53 β i ovčje protu-p53 (SAPU) prepoznaje sve izoforme proteina p53. Za detekciju izoformi proteina p73 koristila sam primarna protutijela kuničje protu-p73 (EP436Y) koje prepoznaje sve izoforme proteina p73 i kuničje protu-p73 (A300-126A) koje prepoznaje samo izoforme TAp73. Membranu sam inkubirala u otopini specifičnog primarnog protutijela preko noći pri +4 °C na zibalici te potom tri puta isprala po 10 min u puferu TBST uz zibanje. Zatim sam membranu inkubirala tijekom 60 min pri sobnoj temperaturi u otopini sekundarnog protutijela (Tablica 4) specifičnog za vrstu primarnog protutijela na koji je vezan enzim peroksidaza iz hrena (HRP, engl. *horse radish peroxidase*) te ponovno ispirala u puferu TBST. Kao supstrat za vizualizaciju koristila sam komplet Western Lightning® Plus-ECL u omjeru reagens A : reagens B = 1 : 1. Membranu sa supstratom inkubirala sam tijekom jedne minute u mraku pri sobnoj temperaturi i stavila u uređaj za vizualizaciju Alliance 4.7.

Tablica 11. Popis primarnih protutijela.

Primarno protutijelo	Porijeklo	Razrjeđenje	Izvor
Protu-p53 SAPU	Ovca	1:5000	Dobiveno ljubaznošću dr.sc. J.C. Bourdona, Dundee, UK
Protu-p53 α 421	Miš	1:1000	
Protu-p53 β	Ovca	1:6000	
Protu-p73 EP436Y	Kunić	1:2000	Abcam, V. Britanija
Protu-p73 A300-126A	Kunić	1:250	Bethyl, SAD
Protu- β -aktin	Miš	1:2000	Proteintech, SAD

Tablica 12. Popis sekundarnih protutijela.

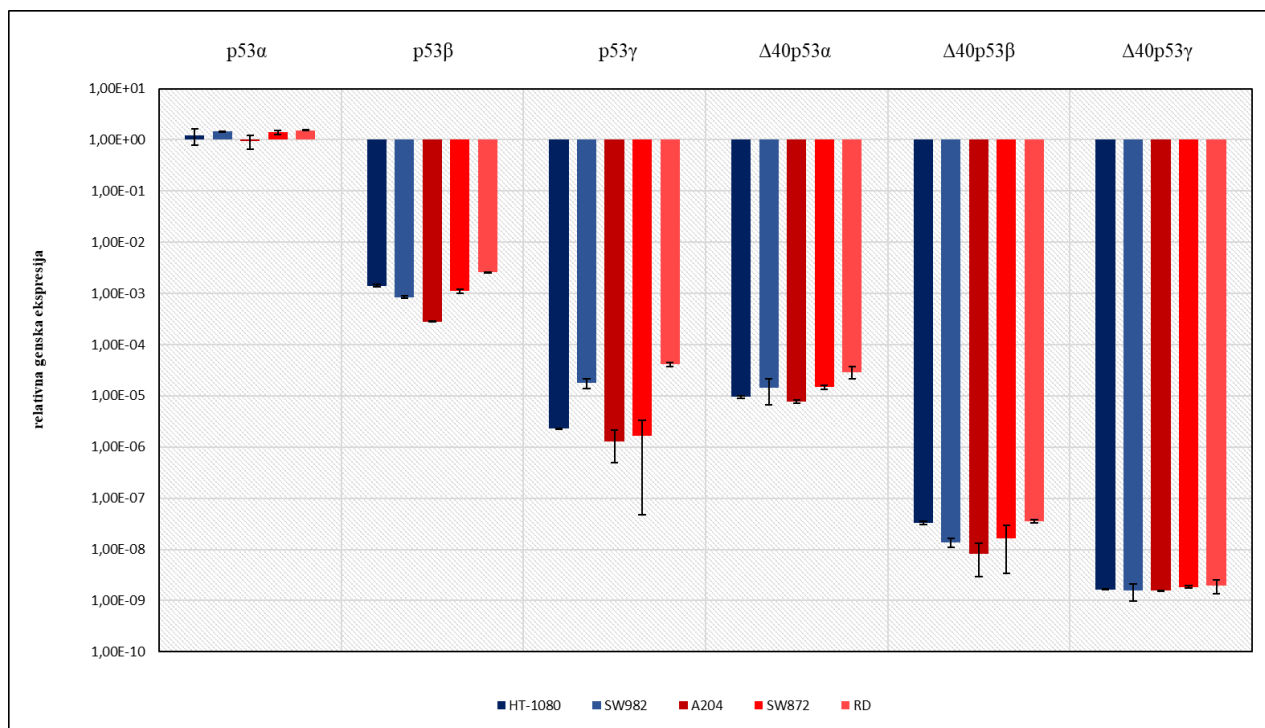
Sekundarno protutijelo	Razrjeđenje	Izvor
Magareće protuovčje Donkey Anti-Sheep IgG	1:3000	Jackson Immuno Research, SAD
Kozje protumišje Goat Anti-Mouse IgG	1:5000	Jackson Immuno Research, SAD
Kozje protukuničje Goat-anti-Rabbit IgG	1:3000	Cell Signaling Technology, SAD

3. Rezultati

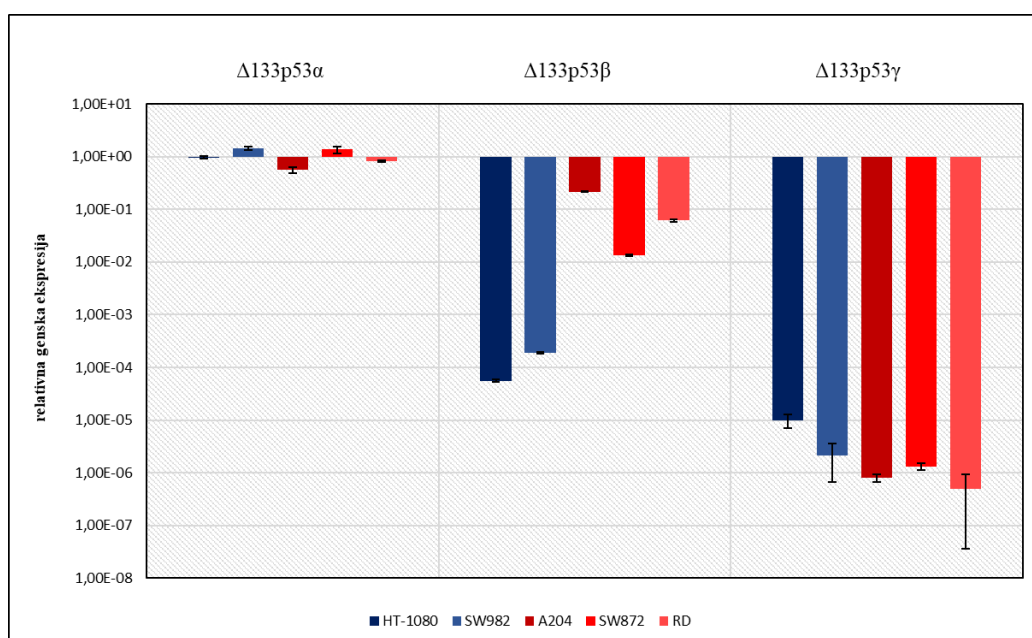
Cilj ovog istraživanja bio je odrediti gensku i proteinsku ekspresiju izoformi p53 i p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka SW872 (liposarkom, p53mt), A204 (rabdiosarkom, p53mt), SW982 (sinovijalni sarkom, p53wt), RD (rabdiosarkom, p53mt), HT-1080 (fibrosarkom, p53wt). Iz stanica svih staničnih linija izolirala sam ukupne proteine metodom sonikacije u PBS-u. Ekspresija izoformi proteina p53 i p73 praćena je metodom Western blota primjenom odgovarajućeg primarnog i sekundarnog protutijela. Rezultati analize Western blota obrađeni su korištenjem programa Adobe Photoshop CS4. Za određivanje genske ekspresije izolirala sam ukupnu RNA iz staničnih linija i metodom reverzne transkripcije prevela RNA u cDNA. Ekspresiju izoformi gena *TP53* i *TP73* određivala sam metodom qPCR.

3.1. Ekspresija izoformi gena *TP53*

Za ekspresiju izoformi gena *TP53* koristila sam prilagođenu metodu ugniježdenog PCR-a koja uključuje dvije uzastopne reakcije PCR, prvu pre-amplifikacijsku reakciju u kojoj sam umnožila „duge” i „kratke” izoforme, i drugu qPCR reakciju kojom sam odredila razinu ekspresije specifične izoforme. Kao referentnu vrijednost za normalizaciju ekspresije pojedinih izoformi koristila sam ukupnu ekspresiju svih izoformi gena *TP53*. Rezultate ekspresije izoformi gena *TP53* odvojila sam na „duge” i „kratke” jer sam u reakciji pre-amplifikacije dugih izoformi koristila 25 ng DNA, dok sam u reakciji pre-amplifikacije kratkih izoformi koristila 50 ng DNA. Nakon završetka reakcije, pre-amplificirane duge izoforme razrijedila sam 400 puta, a kratke 200 puta. Rezultate koje sam dobila prikazala sam kao relativnu gensku ekspresiju za „duge” i „kratke” izoforme gena *TP53*. Za „duge” izoforme gena *TP53*, p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ dobila sam da su izoforme p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ slabije eksprimirane u svim staničnim linijama u odnosu na izoformu p53 α (Slika 13). Ekspresija izoformi gena *TP53* slična je u staničnim linijama u kojima je mutiran gen *TP53* i u staničnim linijama s divljim tipom gena *TP53* (Slika 13). Kod „kratkih” izoformi gena *TP53*, Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ pokazano je da su izoforme Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ slabije eksprimirane u odnosu na izoformu Δ 133p53 α (Slika 14). U staničnim linijama u kojima je mutirani gen *TP53* (A204, SW872 i RD) izoforma Δ 133p53 β slabije je eksprimirana u odnosu na stanične linije (HT-1080 i SW982) u kojima je divlji tip gena *TP53* (Slika 14).



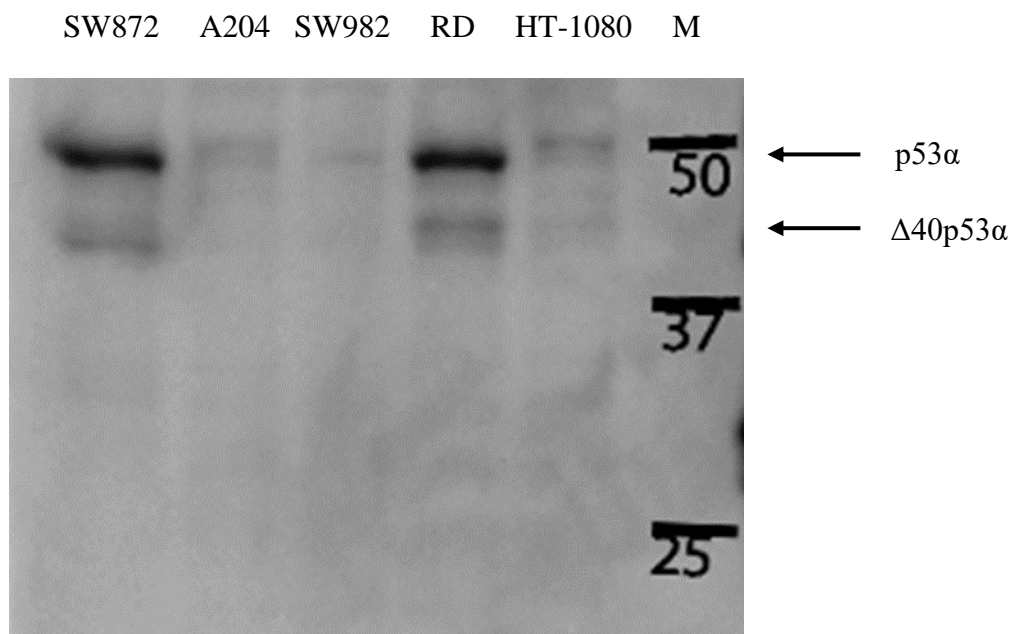
Slika 13. Prikaz relativne genske ekspresije „dugih“ izoformi gena *TP53* u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka HT-1080, SW982, A204, SW872 i RD normalizirane prema ukupnoj ekspresiji svih izoformi gena *TP53*. Stanične linije s divljim tipom gena *TP53* prikazane su plavo, a stanične linije s mutiranim genom *TP53* crveno. Prikazane su srednje vrijednosti ekspresije \pm standardna devijacija.



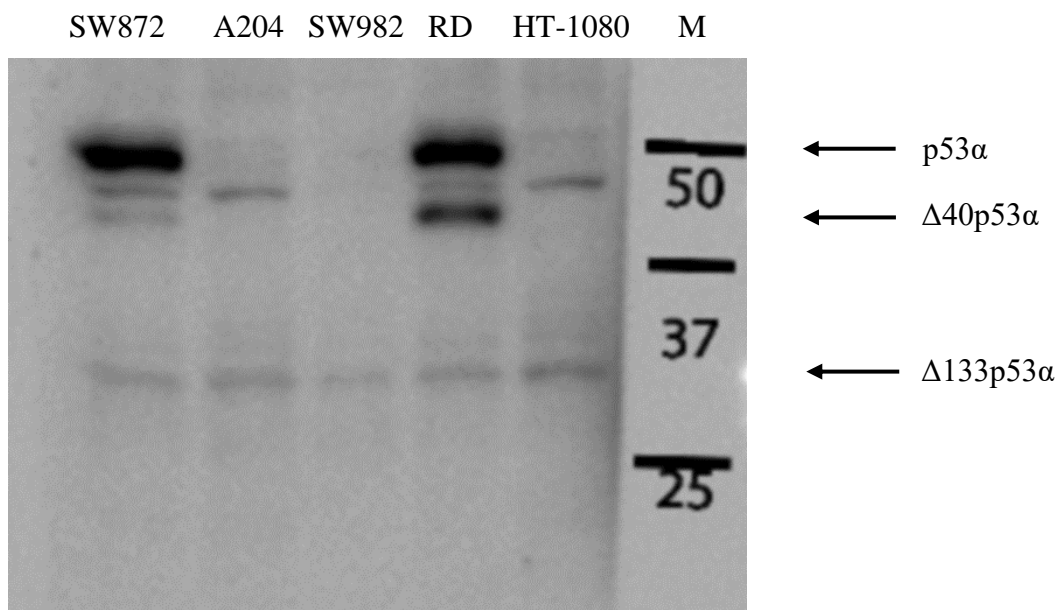
Slika 14. Prikaz relativne genske ekspresije „kratkih“ izoformi gena *TP53* u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka HT-1080, SW982, A204, SW872 i RD normalizirane prema ukupnoj ekspresiji svih izoformi gena *TP53*. Stanične linije s divljim tipom gena *TP53* prikazane su plavo, a stanične linije s mutiranim genom *TP53* crveno. Prikazane su srednje vrijednosti ekspresije \pm standardna devijacija.

3.2. Ekspresija izoformi proteina p53

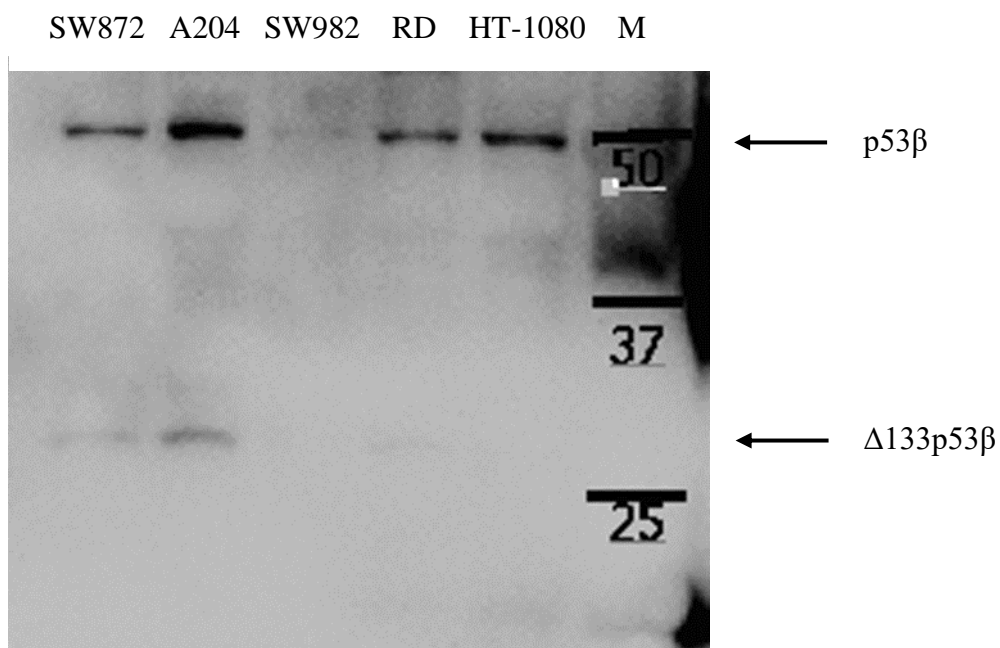
Zbog složene građe gena *TP53*, protein p53 ima mnogobojne izoforme. Sveukupno, gen *TP53* kodira 9 varijanti mRNA (p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β i Δ 40p53 γ , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ), odnosno 12 izoformi proteina p53 (uz navedene Δ 160p53 α , Δ 160p53 β i Δ 160p53 γ). Za detekciju izoformi proteina p53 koristila sam sljedeća primarna protutijela: protu-p53 α (421, prepoznaje izoforme p53 α , Δ 40p53 α , Δ 133p53 α i Δ 160p53 α), protu-p53 β (prepoznaje izoforme p53 β , Δ 40p53 β , Δ 133p53 β i Δ 160p53 β) te protu-p53 (SAPU, prepoznaje sve izoforme proteina p53). Rezultati pokazuju da su izoforme proteina p53 α i Δ 40p53 α jače eksprimirane u staničnim linijama SW872 i RD detektirane protutijelom SAPU (Slika 15) i 421 (Slika 16). Izoforma Δ 133p53 α podjednako je eksprimirana u svim staničnim linijama (Slika 16). Nadalje, izoforma p53 β najjače je eksprimirana u staničnoj liniji A204, a najslabije u SW982, dok je izoforma Δ 133p53 β jedino eksprimirana u staničnim linijama A204 i slabo u SW872 (Slika 17). Iz pregleda ekspresije svih izoformi proteina p53 u staničnim linijama (Slika 18) vidim da stanične linije SW872 i RD imaju eksprimirane gotovo sve izoforme, osim Δ 133p53 β u staničnoj liniji RD, dok stanična linija SW982 ima najmanju ekspresiju proteina p53 (Tablica 13).



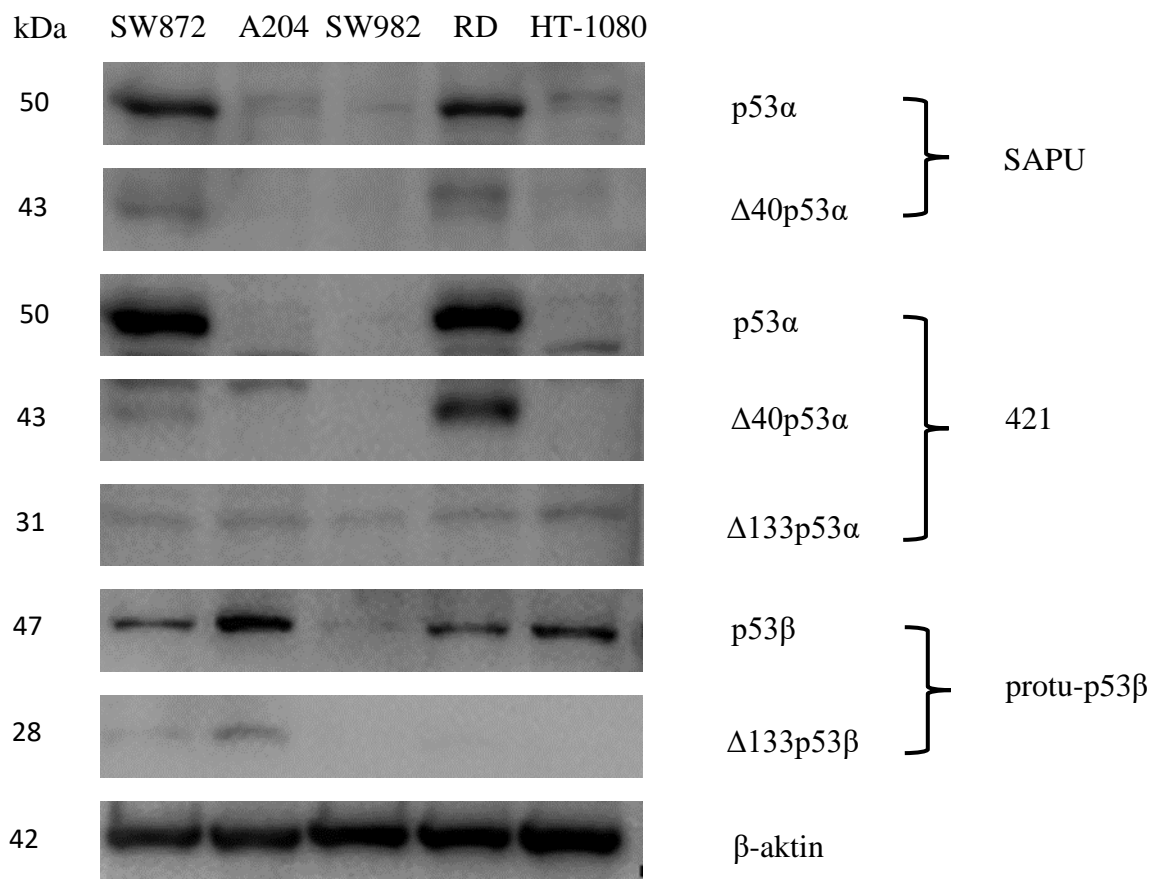
Slika 15. Prikaz rezultata ekspresijske analize proteina izoliranih iz staničnih linija sarkoma mekih tkiva čovjeka SW872, A204, SW982, RD i HT-1080 detektiranih primarnim protutijelom SAPU. M – proteinski marker.



Slika 16. Prikaz rezultata ekspresijske analize proteina izoliranih iz staničnih linija sarkoma mekih tkiva čovjeka SW872, A204, SW982, RD i HT-1080 detektiranih primarnim protutijelom 421. M – proteinski marker.



Slika 17. Prikaz rezultata ekspresijske analize proteina izoliranih iz staničnih linija sarkoma mekih tkiva čovjeka SW872, A204, SW982, RD i HT-1080 detektiranih primarnim protutijelom β. M – proteinski marker.



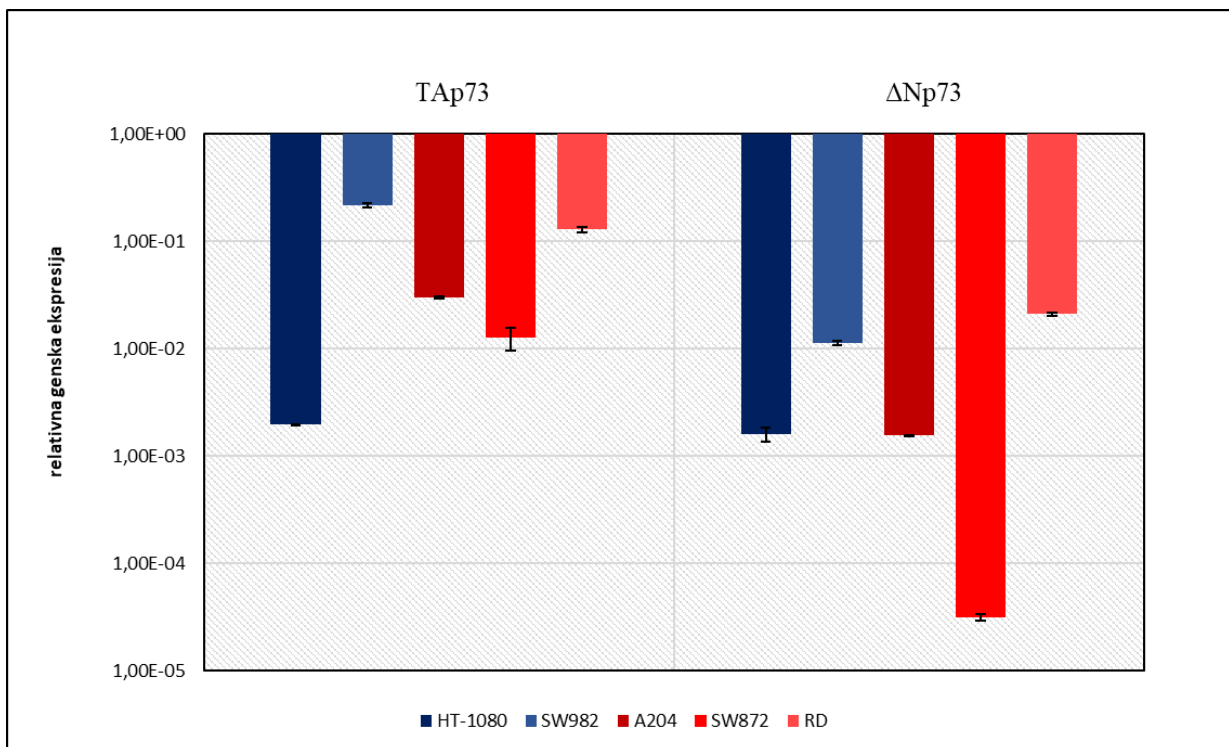
Slika 18. Pregled ekspresije svih izoformi proteina p53 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka SW872, A204, SW982, RD i HT-1080. Proteini su detektirani protutijelima SAPU, 421, protu-p53β i protu-β-aktin.

Tablica 13. Ekspresija izoformi proteina p53 u staničnim linijama SW872, A204, SW982, RD, HT-1080 normalizirana ekspresijom β-aktina.

Izoforme	SW872	A204	SW982	RD	HT-1080
p53α (SAPU)	+++	+	+	+++	+
Δ40p53α (SAPU)	+	-	-	+	-
p53α (421)	+++	-	-	+++	-
Δ40p53α (421)	+	-	-	++	-
Δ133p53α (421)	+	+	+	+	+
p53β (β)	++	+++	+	++	++
Δ133p53β (β)	+	+	-	-	-

3.3. Ekspresija izoformi gena *TP73*

Za ekspresiju izoformi gena *TP73* koristila sam sonde obilježene fluorescentnom bojom. Kao referentni gen koristila sam protein koji veže sekvencu TATA (TBP). Rezultate koje sam dobila prikazala sam kao relativnu gensku ekspresiju sveukupnih izoformi TAp73 i Δ Np73. Rezultate koje sam dobila pokazuju da su kraće izoforme Δ Np73 slabije eksprimirane u svim staničnim linijama u odnosu na izoforme TAp73, osim u staničnoj liniji HT-1080 gdje je podjednaka ekspresija izoformi i TAp73 i Δ Np73 (Slika 19).

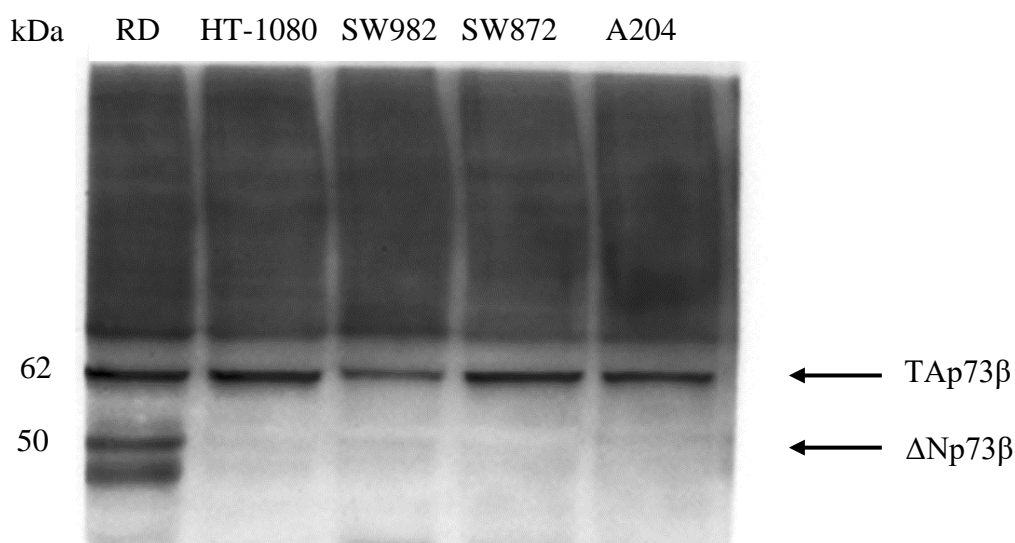


Slika 19. Prikaz relativne genske ekspresije za pojedinu izoformu gena *TP73* u staničnim linijama HT-1080, SW982, A204, SW872 i RD normalizirane prema ekspresiji gena *TBP*. Stanične linije s divljim tipom gena *TP53* prikazane su plavo, a stanične linije s mutiranim genom *TP53* crveno. Prikazane su srednje vrijednosti ekspresije \pm standardna devijacija.

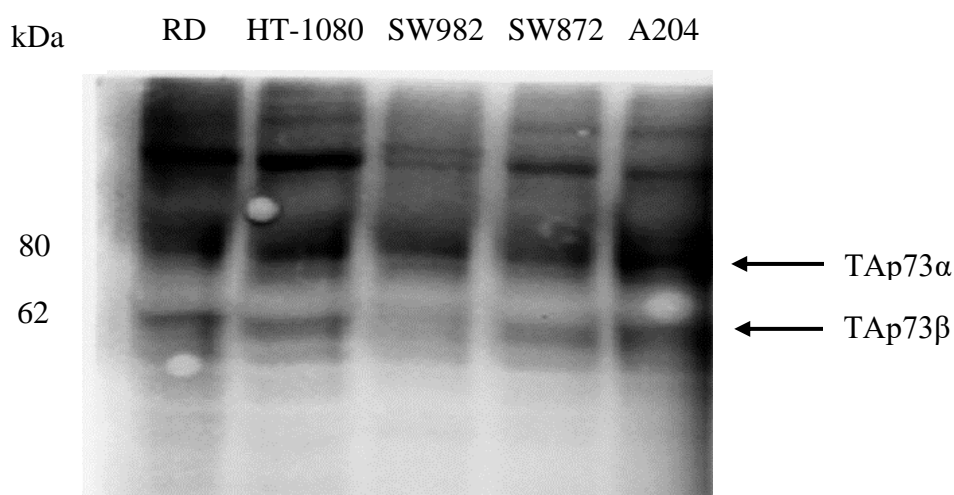
3.4. Ekspresija izoformi proteina p73

Gen *TP73* kao i gen *TP53* ima složenu građu i zbog mogućnosti alternativnog prekrajanjana na 5' kraju i na 3' kraju, kao i unutarnjeg promotora prepisuje 35 različitih mRNA (slika 6). Za detekciju izoformi proteina p73 koristila sam primarna protutijela protu-p73 (EP436Y) koje prepoznaje sve izoforme proteina p73 i protu-p73 (A300-126A) koje prepoznaje

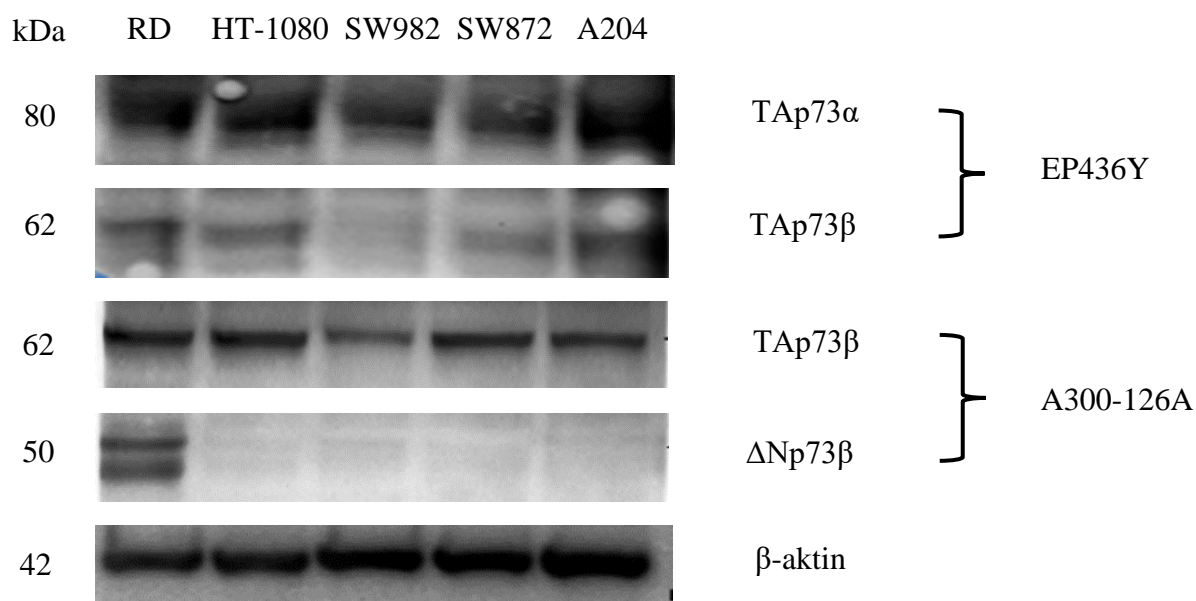
izoforme TAp73. Rezultati pokazuju da je izoforma TAp73 β jače eksprimirana u staničnim linijama RD, HT-1080, SW872 i A204, a slabije u staničnoj liniji SW982 (Slika 20, Slika 21), dok je izoforma Δ Np73 β jedino eksprimirana u staničnoj liniji RD (Slika 20). Izoforma TAp73 α podjednako je eksprimirana u svim staničnim linijama (Slika 21). Iz pregleda ekspresije svih izoformi proteina p73 u staničnim linijama (Slika 22) vidim da stanična linija RD ima sve izoforme eksprimirane, dok stanična linija SW982 ima najmanje eksprimiranih izoformi proteina p73 (Talica 14).



Slika 20. Prikaz ekspresijske analize proteina izoliranih iz staničnih linija sarkoma mekih tkiva čovjeka RD, HT-1080, SW982, SW872 i A204 detektiranih primarnim protutijelom EP436Y.



Slika 21. Prikaz ekspresijske analize proteina izoliranih iz staničnih linija sarkoma mekih tkiva čovjeka RD, HT-1080, SW982, SW872 i A204 detektiranih primarnim protutijelom A300-126A.



Slika 22. Pregled ekspresije svih izoformi proteina p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka RD, HT-1080, SW982, SW872 i A204. Proteini su detektirani protutijelima EP436Y, A300-126A i protu- β -aktin.

Tablica 14. Ekspresija izoformi proteina p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka RD, HT-1080, SW982, SW872 i A204 normalizirana ekspresijom β -aktina.

Izoforma	RD	HT-1080	SW982	SW872	A204
TAp73 α	+++	+++	+++	+++	+++
TAp73 β	+++	+++	+	+++	+++
Δ Np73 β	+++	-	-	-	-

4. Rasprava

Protein p53, kodiran genom *TP53*, vjerojatno je najopsežnije proučavan tumorsupresorski protein. Ima mnogobrojne uloge te je važan regulator metaboličke homeostaze u većini glavnih staničnih procesa (Moulder i sur. 2018). U tumorima ljudi protein p53 jedan je od najčešće mutiranih proteina sa stopom mutacija većom od 50% (Slade i sur. 2010). Različiti signali stresa kao što je hipoksija, ultraljubičasto zračenje, oksidativni stres ili kemijski agensi dovode do povećane razine p53 u stanici. Ovisno o intenzitetu oštećenja, p53 zaustavlja stanični ciklus sudjelujući u popravku DNA te potiče staničnu smrt ili stanično starenje sprječavajući nastanak tumora (Lane i Levine 2010, Moll i Slade 2004). Mutacije u genu *TP53* najčešće su genetske promjene u sarkomu mekog tkiva sa stopom mutacija od 12% do 21% (Von Mehren i sur. 2016). Das i sur. (2007) su pokazali da se osim mutacija u domeni koja veže DNA između eksona 5 i 8, mutacije pojavljuju u čitavom genu *TP53* te da je 40% mutacija pronađeno u eksonu 4 gena *TP53*. Kao i protein p53, protein p73 reagira na različite signale stresa kao što je aktivacija onkogenima ili oštećenje DNA (Zawacka-Pankau i sur. 2010). Izoforme p73 imaju i mogućnost stvaranja heterotetramera s izoformama p53 (Moll i Slade 2004, Zorić i sur. 2013). TAp73 može inducirati transkripciju gena induciranih s p53 kao što su *p21/WAF1*, *GADD45*, *14-3-3 σ* , *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95/FAS*, *PIG3* i *p53AIP1*. I TAp73 i Δ Np73 prekomjerno su eksprimirani u mnogim tumorima, a najčešće prevladava visoka ekspresija izoformi Δ Np73.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti gensku i proteinsku ekspresiju izoformi p53 i p73 u staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka. Sarkomi mekih tkiva su heterogena skupina rijetkih tumora mezenhimskog porijekla. Postoji više od 50 različitih podtipova od koji su najčešći angiosarkom, liposarkom, leiomiosarkom, sinovijalni sarkom, rabdomiosarkom i Ewingov sarkom (Hoang i sur. 2018). Ekspresijski profil p53/p73 određivala sam u staničnim linijama SW872 (liposarkom), A204 (rabdomiosarkom), SW982 (sinovijalni sarkom), RD (rabdomiosarkom) i HT-1080 (fibrosarkom). U staničnim linijama u kojima je gen *TP53* mutiran, SW872, A204 i RD, našla sam da je povećana ekspresija izoformi p53 α , p53 β i Δ 40p53 α . Analizom genske ekspresije pojedine izoforme metodom ugniježđenog PCR-a također sam ustanovila pojačanu ekspresiju izoformi p53 α . U staničnim linijama u kojima protein p53 nije mutiran, SW982 i HT-1080, našla sam da su izoforme p53 α , Δ 133p53 α i p53 β relativno nisko eksprimirane na razini proteina, ali su p53 α i Δ 133p53 α pojačano eksprimirane na razini mRNA. U literaturi ne postoje podaci o ekspresiji izoformi p53/p73 u sarkomu mekih tkiva, ali njihova ekspresija ispitivana je u nekoliko različitih vrsta tumora. Florijan Knezović i

sur. (2019) uočili su različitu ekspresiju izoformi p53 u tumoru bubrega, ovisno o mutacijskom statusu. Tako je u tumorima s divljim tipom p53, $\Delta 133p53$ slabije eksprimiran u usporedbi sa zdravim okolnim tkivom. U drugom istraživanju tumora bubrega nađeno je da su prekomjerno eksprimirane izoforme p53 β i $\Delta 133p53$ u usporedbi s normalnim stanicama (Song i sur. 2009). U melanomu je pokazano da su izoforme p53 β i $\Delta 40p53$ eksprimirane u tumorskim stanicama, ali ne i u melanocitima ili fibroblastima (Avery-Kiejda i sur. 2008). U još nekoliko kliničkih studija ispitivana je ekspresija izoformi p53 u nekoliko tipova tumora te je potvrđeno da izoforme p53 male molekularne mase mogu imati važnu ulogu u tumorigenezi (Takahashii sur. 2013, Hofstetter i sur. 2010, Nutthasirikul i sur. 2013, Anensen i sur. 2006, Bourdon i sur. 2011). Nedavno je pokazano da sve izoforme $\Delta 133p53$ potiču invaziju tumora i metastaziranje s tim da je izoforma $\Delta 133p53\beta$ najučinkovitija (Gadea i sur. 2016).

Slatter i sur. (2011) su napravili miša koji eksprimira $\Delta 122p53$, kako bi oponašao ljudski $\Delta 133p53$. Pokazalo se da je mutant proteina $\Delta 122p53$ aktivan u poticanju hiperproliferacije i razvoja tumora, unatoč tome što je izgubio obje transaktivacijske domene i dio domene koja veže DNA. Osim toga, miševi s $\Delta 122p53$ pokazuju proupalni fenotip s povećanim koncentracijama interleukina-6 i drugih proupalnih citokina s agregacijom limfocita u plućima i jetri. Stoga, $\Delta 133p53$ može stimulirati migraciju stanica, angiogenezu i time progresiju tumora reguliranjem ekspresije angiogenih gena. Sve to potvrđuje da $\Delta 133p53$ ima važnu biološku ulogu (Surget i sur. 2013). Za razliku od $\Delta 133p53\alpha$ koji potiče proliferaciju, p53 β potiče replikativno starenje (Slika 7).

Analizom proteinske ekspresije izoformi proteina p73 našla sam da je izoforma TAp73 β bila jače eksprimirana u staničnim linijama RD, HT-1080, SW872 i A204, dok je izoforma $\Delta Np73\beta$ bila jedino eksprimirana u staničnoj liniji RD. Izoforma TAp73 α bila je snažno eksprimirana u svim staničnim linijama. Analizom genske ekspresije dobila sam vrlo nisku ekspresiju i TAp73 i $\Delta Np73$ u svim staničnim linijama. Nedosljednosti između genske i proteinske ekspresije nisu neuobičajene zbog brojnih alternativnih prekrajanja i različitih mjesta početka translacije. Važno je napomenuti da sam u analizi genske ekspresije određivala sveukupne izoforme TAp73 i $\Delta Np73$, dok sam u analizi proteinske ekspresije mogla odrediti ekspresiju pojedinačne izoforme, TAp73 α , TAp73 β i $\Delta Np73\beta$. Izoforma $\Delta Np73$ je često prekomjerno eksprimirana u rabdiosarkomu i bitna je za progresiju tumora *in vivo* (Cam i sur. 2006). U staničnoj liniji RD dobila sam povećanu ekspresiju $\Delta Np73\beta$. Protein p73 uključen je u zaustavljanje staničnog ciklusa uzrokovanog miogenskom diferencijacijom. Indukcija diferencijacije inducira ekspresiju TAp73 β u miogenim stanicama, što zauzvrat pokreće

ekspresiju inhibitora staničnog ciklusa p57KIP2, koji inhibira komplekse ciklin/CDK i potiče hipofosforilaciju proteina retinoblastoma. Potencijalna onkogeni uloga $\Delta Np73$ u rhabdomiosarkomu upućuje da $\Delta Np73$ surađuje s tipičnim onkogenima, kao što je Pax3, u izazivanju mioblastne maligne transformacije *in vivo*. Protein p73 je neprimjetan u normalnom mišiću, ali je eksprimiran u rhabdomiosarkomu, gdje su prisutni i TAp73 i $\Delta Np73$ (Rufini i sur. 2011). Kliničke studije pokazale su pojačanu ekspresiju i TAp73 i $\Delta Np73$ u mnogim tumorima a ravnotežu među njima određuje ishod (Moll i Slade 2004).

Porodicu proteina p53 ima ključnu ulogu u kontroli mnogih kritičnih staničnih funkcija. Svi članovi porodice p53 eksprimiraju mnogobrojne izoforme. Brojna istraživanja također pružaju nove poglede na njihovo funkcionalno značenje. Izoforme pridonose novoj razini funkcionalne regulacije mnogih kritičnih bioloških procesa, uključujući staničnu smrt, proliferaciju, kontrolu staničnog ciklusa i tumorigenezu. Ovisno o eksprimiranoj izoformi, uloga gena može se drastično promijeniti od tumor-supresora do onkogeni. Također je utvrđeno da su izoforme u čvrstoj međusobnoj interakciji što utječe na sudbinu stanice ali i na ishod liječenja.

5. Zaključak

1. Analiza ekspresije gena *TP53* pokazala je da su u stanicama sarkoma mekih tkiva čovjeka izoforme p53 α i Δ 133p53 α jače eksprimirane u odnosu na izoforme sa skraćenim C-krajem.
2. Analiza ekspresije proteina pokazala je da su izoforme p53 α i Δ 40p53 α jače eksprimirane u staničnim linijama u kojima je gen *TP53* mutiran (SW872 i RD), dok je izoforma Δ 133p53 α podjednako eksprimirana u svim staničnim linijama.
3. U staničnim linijama sarkoma mekih tkiva čovjeka kraća izoforma gena *TP73*, Δ Np73, slabije je eksprimirana u odnosu na izoformu TAp73.
4. Izoforma TAp73 α podjednako je eksprimirana u svim staničnim linijama dok je izoforma proteina TAp73 β slabije eksprimirana u staničnoj liniji SW982. Izoforma Δ Np73 β eksprimirana je jedino u staničnoj liniji RD (koja ima mutirani gen *TP53*).
5. Izoforme *TP53* i *TP73* pokazuju različit obrazac ekspresije ovisno o staničnoj liniji tj. mutacijskom statusu gena *TP53*.

6. Literatura

Anensen N., Oyal A.M., Bourdon J.C., Kalland K.H., Bruserud O., Gjerzsen B.T. A distinct p53 protein isoform signature reflects the onset of induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 2006, 12, 3985-3992

Avery-Kiejda K.A., Xu D.Z., Adams L.J., Scott R.J., Vojtesek B., Lane D.P., Hersey P. Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. *Clin Cancer Res*, 2008, 14, 1659-1668

Bernard H., Garmy-Susini B., Ainaoui N., Van Den Berghe L., Peurichard A., Javerzat S., Bikfalvi A., Lane D.P., Bourdon J.C., Prats A.C. The p53 isoform, $\Delta 133p53\alpha$, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene*, 2013, 32, 2150-2160

Bénard J., Douc-Rasy S., Ahomadegbe J.C. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat*, 2003, 21, 182-191

Biegging K.T., Attardi L.D. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends Cell Biol*, 2012, 22, 97-106

Bourdon, J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., Lane D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*, 2005, 19, 2122-2137

Bourdon, J.C., Khoury M.P., Diot A., Baker L., Fernandes K., Aoubala M., Quinlan P., Purdie C.A., Jordan L.B., Prats A.C., Lane D.P., Thompson A.M. p53 mutant breast cancer patients expressing p53 γ have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 2011, 13, R7

Brennan M. F., Antonescu C.R., Maki R.G. Management of soft tissue sarcoma. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2013, 24-25

Buhlmann S., Pützer B.M. $\Delta Np73$ a matter of cancer: Mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*, 2008, 1785, 207-216

Cam H., Griesmann H., Beitzinger M., Beitzinger M., Hofmann L., Beinoraviciute-Kellner R., Sauer M., Hüttinger-Kirchhof N., Oswald C., Friedl P., Gattenlöhner S., Burek C., Rosenwald A., Stiewe T. p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. *Cancer Cell*, 2006, 10, 281-293

Campbell H., Fleming N., Roth I., Mehta S., Wiles A., Williams G., Vennin C., Arsic N., Parkin A., Pajic M., Munro F., McNoe L., Black M., McCall J., Slatter T.L., Timpson P., Reddel R., Roux P., Print C., Baird M.A., Braithwaite A.W. $\Delta 133p53$ isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. *Nat Commun*, 2018, 9, 254-268

Chircop M., Speidel D. Cellular Stress Responses in Cancer and Cancer Therapy. *Front Oncol*, 2014, 4, 8-9

Das P., Kotilingam D., Korchin B., Liu J., Yu D., Lazar A. J., Pollock R. E., MD, Lev D. High prevalence of p53 exon 4 mutations in soft tissue sarcoma. *Cancer*, 2007, 109, 2323-2333

Domínguez G., García J.M., Peña C., Silva G., Garcia V., Martinez L. Maximiano C., Gómez M.E., Rivera J.A., García-Andrade C., Bonilla F. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *J Clin Oncol*, 2006, 24, 805-15

Engelmann D., Meier C., Alla V., Pützer B.M. A balancing act: Orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression. *Oncogene*, 2015, 34, 4287-4299

Fillippovich I., Sorokina N., Gatei M., Haupt Y., Hobson K., Moallem E., Spring K., Mould M., McGuckin M.A., Lavin M.F., Khanna K.K. Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene*, 2001, 20, 514-22

Grob T.J., Novak U., Maise C., Barcaroli D., Luthi A.U., Pirnia F., Hugli B., Graber H.U., De Laurenzi V., Fey M.F., Melino G., Tobler A. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*, 2001, 8, 1213-1223

Hofstetter G., Berger A., Fiegl H., Slade N., Zorić A., Holzer B., Schuster E., Mobus V.J., Reimer D., Daxenbichler G., Marth C., Zeimet A.G., Concin N., Zeillinger R. Alternative splicing of p53 and p73: The novel p53 splice variant p53 is an independent prognostic marker in ovarian cancer. *Oncogene*, 2010, 29, 1997-2004

Joerger A.C., Wilcken R., Andreeva A. Tracing the evolution of the p53 tetramerization domain. *Structure*, 2014, 22, 1301-1310

Joruiz S.M., Bourdon J.C. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, a026039

Kim S., An S.S.A. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)*, 2016, e39931

Knezović Florijan M., Ozretić P., Bujak M., Pezzè L., Ciribilli Y., Kaštelan Ž., Slade M., Hudolin T. The role of p53 isoforms' expression and p53 mutation status in renal cell cancer prognosis. *Urol Oncol Semin Orig Investig*, 2019, 37, 578.e1-578.e10

Lane D.P. i Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2010, 2, a000893

Liu G., Nozell S., Xiao H., Chen X. $\Delta Np73\beta$ is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 487-501

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25, 402-408

Logotheti S., Pavlopoulou A., Galtsidis S., Vojtesek B., Zoumpourlis V. Functions, divergence and clinical value of TAp73 isoforms in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32, 511-534

Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., Scoble H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev*. 2004, 18, 306-319

Moll U.M., Erster S., Zaika A. p53, p63 and p73-solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta*. 2001, 15, 47-59

Moll U.M. i Slade N. p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation. *Molecular Cancer Res*, 2004, 2, 371-386

Moulder D.E., Hatoum D., Tay E., Lin Y., McGowan E.M. The roles of p53 in mitochondrial dynamics and cancer metabolism: The pendulum between survival and death in breast cancer? *Cancers*, 2018, 10, pii: E189

Mondal A.M., Horikawa I., Pine S.R., Fujita K., Morgan K.M., Vera E., Mazur S.J., Appella E., Vojtesek B., Blasco M.A., Lane D.P., Harris C.C. p53 isoforms regulate aging- and tumor-associated replicative senescence in T lymphocytes. *J Clin Investig*, 2013, 123, 5247-5257

Murray-Zmijewski F., Lane D.P., Bourdon J.C. p53/p63/p73 isoforms: An orchestra of isoforms to harmonize cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, 2006, 13, 962-972

Nutthasirikul N., Limpiboon T., Leelayuwat C., Patrakitkomjorn S., Jearanaikoon P. Ratio disruption of the $\Delta 133p53$ and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol*, 2013, 42, 1181–1188

Ozaki T., Kubo N., Nakagawara A. p73-Binding partners and their functional significance. *Int J Proteomics*, 2010, 20, 1-12

Pflaum J., Schlosser S., Möller M. p53 Family and cellular stress responses in cancer. *Front Oncol* 2014, 4, 1-15

Rufini A., Agostini M., Grespi F., Tomasini R., Sayan B.S, Niklison-Chirou M.V., Conforti F., Velletri T., Mastino A., Mak T.W., Melino G., Knight R.A. p73 in cancer. *Genes Cancer*, 2011, 2, 491-502

Seetharam M., Kolla K. R., Chawla S. P. Metastatic soft tissue sarcomas: a review of treatments and New Pharmacotherapies. *Clin Oncol*, 2018, 3, 1-10

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

Slatter T.L., Hung N., Campbell H., Rubio C., Mehta R., Renshaw P., Williams G., Wilson M., Engelmann A., Jeffs A., Royds J.A., Baird M.A., Braithwaite A.W. Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a Delta133p53-like isoform. *Blood*, 2011, 117, 5166-5177

Song W., Huo S.W., Lu J.J., Fang X.L., Jin X.B., Yuan M.Z. Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. *Chin Med J*, 2009, 122, 921-926

Stantic M., Sakil H.A.M, Zirath H., Fang T., Sanz G., Fernandez-Woodbridge A., Marina A., Susanto E., Mak T.W., Henriksson M.A., Wilhelm M.T. TAp73 suppresses tumor angiogenesis through repression of proangiogenic cytokines and HIF-1 α activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112, 220-225

Stiewe T., Tuve S., Peter M., Tannapfe A., Elmaagacli A.H., Putzer B.M. Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas, *Clin Cancer Res*, 2004, 10, 626–633

Surget S., Khoury M.P., Bourdon J.C. OncoTargets and Therapy Dovepress Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*, 2014, 7, 57-68

Takahashi R., Giannini C., Sarkaria J.N., Schroeder M., Rogers J., Mastroeni D., Scoble H. p53 isoform profiling in glioblastoma and injured brain. *Oncogene*, 2013, 32, 3165–3174

Vieler M., Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers*, 2018,10, 288-307

Vikhreva P., Melino G., Amelio I. p73 Alternative Splicing: Exploring a Biological Role for the C-Terminal Isoforms. *J Mol Biol*, 2018, 430, 1829-1838

Vilgelm A. El-Rafai W. Zaika A. Therapeutic prospects for p73 and p63: Rising from the shadow of p53. *Drug Resist Update*, 2008, 11, 152-163

Von Mehren M., Randall R.L., Benjamin R.S., Boles S., Bui M.M., Conrad E.U., Ganjoo K.N., George S., Gonzalez R.J., Heslin M.J., Kane J.M., Koon H., Mayerson J., McCarter M., McGarry S.V., Meyer C., O'Donnell R.J., Pappo A.S., Paz I.B., Petersen I.A., Pfeifer J.D., Riedel R.F., Schuetze S., Schupak K.D., Schwartz H.S., Tap W.D., Wayne J.D., Bergman M.A., Scavone J. Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Nat Compr Canc Net*, 2016, 14, 758-786

Wei J., Zaika E., Zaika A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J Nucleic Acid*, 2012, 687359

Weinberg R.L., Veprintsev D.B., Fersht A.R. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol*, 2004, 341, 1145-1159

Yang A., Kaghad M., Wang Y, Gillett E., Fleming M.D., Dötsch V., Andrews N.C., Caput D., McKeon F. „p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities“. *Mol Cell*, 1998 2, 305-316

Yin L., Liu C.X., Nong W.X., Yun Z.C., Yan Q.I., Hong A.L., Wen H.H., Kan S. Feng L. Mutational analysis of p53 and PTEN in soft tissue sarcoma. *Mol Med Rep*, 2012, 5, 457-461

Zaika A.I., Kovalev S., Marchenko N.D., Moll U.M. Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res*, 1999, 59, 3257-63

Zaika A.I., Slade N., Erster S., Sansome C., Joseph T.W., Pearl M., Chalas E., Moll U.M. DeltaNp73, a dominant negative inhibitor of wild type p53 and TA p73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*, 2002, 196, 765-780

Zawacka-Pankau J., Kostecka A., Sznarkowska A., Hedström E., Kawiak A. p73 tumor suppressor protein: A close relative of p53 not only in structure but also in anti-cancer approach? *Cell Cycle*, 2010, 9, 720-728

Zorić A., Horvat A., Slade N. Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis*, 2012, 34, 522-529

7. Životopis

Rođena sam 30.03.1993. godine u Zagrebu. Školovanje sam započela 2000. godine u osnovnoj školi "Ljudevi Gaj" u Zaprešiću. Godine 2008. upisala sam XV. gimnaziju u Zagrebu. Maturirala sam 2012. godine te iste godine upisujem prvu godinu preddiplomskog studija biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Godine 2015. završila sam sveučilišni preddiplomski studij Biologije i stekla akademski naziv sveučilišna prvostupnica biologije. Diplomski studij Molekularne biologije upisala sam 2015. godine. Tijekom studija odradila sam laboratorijsku stručnu praksu na Institutu Ruđer Bošković u Laboratorij za fiziku mora i kemiju vodenih sustava i Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti. Također, sudjelovala sam na manifestaciji "Noć biologije".