

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Sveučilište u Dubrovniku**

**Institut Ruđer Bošković**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij**

**Molekularne bioznanosti**

**Nikolina Hanžić**

**Funkcionalne interakcije p53 i obitelji proteina  
p53/p73, NME i GLI u melanomu čovjeka**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Poslijediplomski interdisciplinarni  
sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti  
Znanstvena polja: 301 Temeljne medicinske znanosti i 105 Biologija

### Funkcionalne interakcije p53 i obitelji proteina p53/p73, NME i GLI u melanomu čovjeka

Nikolina Hanžić

**Disertacija je izrađena u:** Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

**Mentor:** dr. sc. Neda Slade, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

U metastatskom melanomu tumor-supresorski protein p53 rijetko je mutiran, ali nije funkcionalan. Pretpostavljamo da bi njegova funkcija mogla biti inhibirana interakcijama s proteinima obitelji p53/p73, NME i GLI. U tu svrhu ispitali smo njihovu ekspresiju u stanicama i tkivima metastatskog melanoma. Pokazali smo da izoforme p53 i p73 stvaraju komplekse s p53 smanjujući tako njegovu transkripcijsku i apoptotsku aktivnost, a proteini NME i GLI, iako nisu tvorili komplekse s p53, utječu na njegovu aktivnost. Ovim radom pružili smo uvid u jedan od mogućih mehanizama koji u metastatskom melanomu sprečava divlji tip proteina p53 da obavlja svoje funkcije.

**Broj stranica:** 133

**Broj slika:** 64

**Broj tablica:** 24

**Broj literaturnih navoda:** 106

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** melanom, p53, p73, NME, GLI

**Datum obrane:** 11. listopada 2018.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković, predsjednica
2. dr. sc. Sonja Levanat, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković, član
3. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, član
4. dr. sc. Maja Herak Bosnar, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, zamjena

#### Disertacija je pohranjena u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb;  
Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek;  
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruđer Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary Area of Science  
**Scientific Fields:** Basic medical sciences and Biology

### **Functional interplay between p53 and p53/p73, NME and GLI protein families in human melanoma**

**Nikolina Hanžić**

**Thesis performed at:** Laboratory for protein dynamics, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

**Supervisor:** Neda Slade, PhD, senior scientist, Ruđer Bošković Institute

#### **Short abstract:**

In metastatic melanoma tumor suppressor protein p53 is not functional, although it is rarely mutated. We assume that p53 function might be altered through the interactions with p53 and p73 isoforms, NME and GLI families of proteins. Their expression profiles were studied in a panel of melanoma cell lines and tissues. We have shown that p53/p73 isoforms form complexes with p53 hence inhibiting its transcriptional and apoptotic activity. Although NME and GLI did not form complexes with p53, they were able to modify its activity. In this work we provide a possible mechanism explaining why p53 function in melanoma is abrogated.

**Number of pages:** 133

**Number of figures:** 64

**Number of tables:** 24

**Number of references:** 106

**Original in:** Croatian

**Key words:** melanoma, p53, p73, NME, GLI

**Date of the thesis defense:** 11<sup>th</sup> October 2018.

#### **Reviewers:**

1. Andreja Ambriović Ristov, PhD, senior scientist, Ruđer Bošković Institute, president of the committee
2. Sonja Levanat, PhD, senior scientist, Ruđer Bošković Institute, member
3. Prof. Vera Cesar, PhD, Full Professor, Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek, member
4. Maja Herak Bosnar, PhD, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, substitute

#### **Thesis deposited in:**

National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb;  
City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek;  
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Nede Slade.

## **ZAHVALE:**

Veliko hvala mentorici dr. sc. Nedi Slade što mi je ukazala povjerenje tijekom zapošljavanja na projekt ProNetMel. Hvala Vam što ste mi dali priliku da pokažem svoju motivaciju i želju za radom. Također Vam zahvaljujem na silnom strpljenju i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Dragoj MJJ, Anđeli i Martini P. hvala na nesebičnoj pomoći, mnogobrojnim savjetima i silnoj potpori koju ste mi pružale tokom izrade ove disertacije. Hvala Petru (od milja Perici) na brojnim asistencijama i pomoći prilikom eksperimentalnog dijela ove disertacije. Hvala i ostalim kolegama LPD-a: Maji Herak Bosnar, Martini Radić, Bastienu Proustu, te kolegama iz LNR-a: Sonji Levanat, Vesni Musani, Maji Sabol i Diani Trnski za svu pomoć i savjete, te ugodnom radnom okruženju.

Hvala mojim diplomantima Lidiji P., Bastienu P., Lani G. i Snježani Đ. na svim divnim trenutcima smijeha, zezancije, ali i ozbiljnog rada. Uljepšali ste mi brojne dane na poslu. Ostalim diplomantima i praktikantima koji su u protekle četiri godine bili ovdje: Luciji, Klari, Martini, Ivani i Ani hvala za sve divne trenutke koje smo dijelili u labosu.

Posebno hvala dr. sc. Jean Christophe Bourdonu, prijatelju i „mentoru“ u čijem sam labosu provela prekrasna tri mjeseca. Hvala za sve znanstvene i one neznanstvene razgovore, na silnim savjetima i nesebičnoj pomoći koju ste mi pružali tokom mog boravka u Ujedinjenom Kraljevstvu, ali i kasnije. Također veliko hvala Regini, Alex i Sebu za sve nezaboravne i luckaste trenutke koje smo proveli zajedno. Bilo je divno biti dio vašeg tima 😊

Hvala mojim prijateljima Ani, Heleni i Mladenu, te mojim MoleCoolarcima - Jeleni, Zrinku, Petri, Luciji, Saši, Mateji i Ingi na potpori, podršci i savjetima bilo onih privatne, bilo profesionalne prirode. Hvala na svim divnim „reunionima“ i „pivama“ na kojima sam punila baterije.

Hvala mojoj obitelji, roditeljima Ljubici i Branku, te sestri Mireli koji su mi oduvijek bili najveća potpora i oslonac. Bez vaše bezuvjetne podrške ništa od ovog nebi bilo moguće. Stoga posvećujem ovu doktorsku disertaciju vama, ali i Bogu koji me neprestano prati, vodi i čuva.

## POPIS KRATICA

**BD**, bazno područje (od engl. *Basic domain*)

**BSA**, albumin iz goveđeg seruma (od engl. *Bovine serum albumine*)

**coIP**, metoda ko-imunoprecipitacije (od engl. *Co-immunoprecipitation*)

**DBD**, DNA-vezno područje (od engl. *DNA-binding domain*)

**GLI1**, (od engl. *Glioma-Associated Oncogene Homolog 1*)

**GLI2**, (od engl. *Glioma-Associated Oncogene Homolog 2*)

**GLI3**, (od engl. *Glioma-Associated Oncogene Homolog 3*)

**ID**, inhibitorno područje (od engl. *Inhibitory domain*)

**NLS**, signalno područje za smještanje u jezgru (od engl. *Nuclear localization signal*)

**NME1**, nm23 nukleozid difosfat kinaza 1 (od engl. *NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1*)

**NME2**, nm23 nukleozid difosfat kinaza 2 (od engl. *NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2*)

**OD**, oligomerizacijsko područje (od engl. *Oligomerization domain*)

**PBS**, fosfatni pufer (od engl. *Phosphate buffer saline*)

**PRD**, područje bogato prolinom (od engl. *Proline rich domain*)

**qPCR**, metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (od engl. *Quantitative polymerase chain reaction*)

**SAM**, područje sa sterilnim  $\alpha$ -motivom (od engl. *Sterile  $\alpha$  motif*)

**TAD**, transaktivacijsko područje (od engl. *Transactivation domain*)

**TP53; p53**, tumorski protein p53 (od engl. *Tumor protein p53*)

**TP63; p63**, tumorski protein p63 (od engl. *Tumor protein p63*)

**TP73; p73**, tumorski protein p73 (od engl. *Tumor protein p73*)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Obitelj proteina p53.....	1
1.1.1. Povijest obitelji gena/proteina p53 .....	1
1.1.2. Geni obitelji p53 imaju složenu građu.....	2
1.1.3. Proteini obitelji p53 imaju sličnu strukturu .....	4
1.1.4. Proteini obitelji p53 imaju mnogobrojne uloge u stanicima .....	5
1.1.5. Proteini obitelji p53 tvore tetramere.....	6
1.2. Obitelj proteina NME.....	8
1.3. Obitelj proteina GLI.....	10
1.4. Funkcionalne interakcije tumor supresorskog proteina p53 s izoformama p53/p73, te proteinima iz obitelji NME i GLI.....	13
1.4.1. Interakcije proteina p53 $\alpha$ i izoformi p53 male molekulske mase.....	13
1.4.2. Interakcije proteina p53 $\alpha$ i izoformi p73 .....	16
1.4.3. Interakcije proteina p53 i obitelji proteina NME.....	18
1.4.4. Interakcije proteina p53 i obitelji proteina GLI.....	19
1.5. Metastatski melanom.....	20
1.5.1. Metastatski melanom kao jedan od najagresivnijih tumora .....	20
1.5.2. Metastatski melanom nastaje uslijed izlaganja UV-zračenju .....	22
1.5.3. Protein p53 je neaktivan u metastatskom melanomu .....	23
2. CILJEVI RADA .....	24
3. MATERIJALI I METODE .....	25
3.1. Biološki materijal .....	25
3.1.1. Kompetentne bakterije.....	25
3.1.2. Stanične linije .....	25
3.1.3. Ispitanici .....	26
3.2. Rad s bakterijskim kulturama.....	26
3.2.1. Transformacija bakterija plazmidnim vektorima .....	26
3.2.2. Izolacija plazmidne DNA .....	27
3.3. Rad sa staničnim kulturama .....	27
3.3.1. Uzgoj staničnih kultura.....	28
3.3.2. Prolazna transfekcija stanica u kulturi.....	29
3.3.2.1. Prolazna transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA .....	29
3.3.2.2. Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim molekulama RNA .....	30

3.3.3. Izazivanje oštećenja DNA .....	31
3.3.3.1. Oštećenje DNA izazvano radijacijskim zračenjem .....	31
3.3.3.2. Oštećenje DNA izazvano kemijskim agensima.....	31
3.3.4. Određivanje preživljenja stanica testom MTT .....	31
3.3.4.1. Određivanje optimalnog broja stanica za nasađivanje .....	32
3.3.4.2. Određivanje preživljenja stanica .....	33
3.4. Analiza RNA .....	34
3.4.1. Izdvajanje ukupne RNA .....	34
3.4.2. Reverzna transkripcija .....	35
3.4.3. Kvantitativni PCR (qPCR, <i>real-time</i> PCR) .....	36
3.4.3.1. qPCR metodom SYBR green-a .....	36
3.4.3.2. qPCR koristeći hidrolizirajuće TaqMan sonde.....	40
3.4.3.3. qPCR koristeći TaqMan ekspresijske komplete .....	41
3.5. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot.....	42
3.5.1. Izdvajanje proteina .....	42
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA i priprema uzoraka za elektroforezu..	42
3.5.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida .....	43
3.5.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu .....	44
3.5.5. Bojanje i blokiranje membrane .....	44
3.5.6. Imunodetekcija proteina na nitroceluloznoj membrani .....	45
3.6. Analiza proteinskih interakcija metodama ko-imunoprecipitacije.....	47
3.6.1. Ko-imunoprecipitacija upotrebom agaroznih kuglica .....	48
3.6.2. Ko-imunoprecipitacija upotrebom magnetskih zrnaca DynaBeads™ Protein G .....	48
3.7. Određivanje transkripcijske aktivnosti gena luciferaznim testom.....	49
3.8. Mjerenje apoptoze na protočnom citometru.....	50
3.9. Statistička obrada podataka .....	51
4. REZULTATI.....	52
4.1. Ekspresija gena obitelji p53, p73, NME i GLI.....	52
4.1.1. Ekspresija izoformi gena <i>TP53</i> .....	54
4.1.1.1. Ekspresija izoformi gena TP53 u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva .....	54
4.1.1.2. Ekspresija gena TP53 u staničnim linijama melanoma čovjeka.....	56
4.1.2. Ekspresija izoformi gena <i>TP73</i> .....	57



4.1.2.1. Ekspresija izoformi gena TP73 u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva .....	57
4.1.2.2. Ekspresija izoformi gena TP73 u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	58
4.1.3. Ekspresija gena obitelji NME.....	59
4.1.3.1. Ekspresija gena obitelji NME u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva .....	59
4.1.3.2. Ekspresija gena obitelji NME u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	60
4.1.4. Ekspresija gena obitelji GLI.....	61
4.1.4.1. Ekspresija gena obitelji GLI u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva .....	61
4.1.4.2. Ekspresija gena obitelji GLI u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	62
4.2. Korelacijska analiza ekspresije gena .....	64
4.3. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI .....	66
4.3.1. Ekspresija proteina obitelji p53 .....	66
4.3.1.1. Ekspresija proteina obitelji p53 u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu .....	68
4.3.1.2. Ekspresija proteina obitelji p53 u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima .....	71
4.3.2. Ekspresija proteina obitelji p73 .....	75
4.3.2.1. Ekspresija proteina obitelji p73 u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu .....	76
4.3.2.2. Ekspresija proteina obitelji p73 u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima .....	79
4.3.3. Ekspresija proteina obitelji NME .....	80
4.3.3.1. Ekspresija proteina obitelji NME u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu .....	80
4.3.3.2. Ekspresija proteina obitelji NME u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima .....	82
4.3.4. Ekspresija proteina obitelji GLI .....	83
4.3.4.1. Ekspresija proteina obitelji GLI u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu .....	84
4.3.4.2. Ekspresija proteina obitelji GLI u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima .....	87
4.4. Korelacijska analiza ekspresije proteina .....	90
4.5. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI u uvjetima genotoksičnog stresa .....	91
4.5.1. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI u stanicama melanoma čovjeka nakon izlaganja stanica ionizirajućem $\gamma$ -zračenju .....	91

4.5.2. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI u stanicama melanoma čovjeka nakon izlaganja stanica protutumorskim lijekovima.....	93
4.6. Interakcije proteina p53 s izoformama p53/p73, te proteinima NME i GLI u staničnim linijama melanoma čovjeka.....	95
4.6.1. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s izoformama p53 u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	96
4.6.2. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s izoformama p73 u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	98
4.6.3. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s proteinima obitelji NME u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	99
4.6.4. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s proteinima obitelji GLI u staničnim linijama melanoma čovjeka .....	100
4.7. Utjecaj proteina p53/p73, NME i GLI na transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ .....	101
4.8. Utjecaj proteina p53/p73, NME i GLI na apoptotsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ .....	103
5. RASPRAVA.....	105
5.1. Utjecaj izoformi p53 malih molekulskih masa na protein p53 u metastatskom melanomu .....	107
5.2. Utjecaj izoformi proteina p73 na protein p53 u metastatskom melanomu .....	110
5.3. Utjecaj proteina NME1 i NME2 na protein p53 u metastatskom melanomu .....	112
5.4. Utjecaj proteina GLI1, GLI2 i GLI3 na protein p53 u metastatskom melanomu.....	114
6. ZAKLJUČCI .....	117
7. LITERATURA.....	118
8. SAŽETAK.....	130
9. SUMMARY .....	131
10. ŽIVOTOPIS .....	132

# 1. UVOD

## 1.1. Obitelj proteina p53

### 1.1.1. Povijest obitelji gena/proteina p53

Godine 1979., u razmaku od samo nekoliko mjeseci, četiri istraživačke skupine otkrile su stanični protein koji stupa u interakciju s velikom podjedinicom T-antigena u stanicama transficiranim virusom SV40 (Kress i sur., 1979; Lane i Crawford, 1979; Linzer i Levine, 1979; DeLeo i sur., 1979). S obzirom da je protein bio veličine 53 kDa, nazvali su ga p53. Isprva se vjerovalo da je protein p53 uključen u mehanizam virusne transformacije normalnih stanica u tumorske, te je nazvan tumorskim antigenom. Nekoliko godina kasnije nekolicina znanstvenika pokazala je da protein p53 ima sposobnost imortaliziranja stanica (Eliyahu i sur., 1984; Jenkins i sur., 1984) pa je svrstan u onkogene. Međutim, istovremeno je skupina znanstvenika pokazala suprotno (Pennica i sur., 1984). Uslijedilo je mapiranje gena te su 1989. godine Finlay i suradnici otkrili da je klon koji posjeduje Pennica divlji tip proteina p53, dok su klonovi koje posjeduju ostale skupine istraživača različiti mutanti. Daljnji pokusi na divljem tipu proteina p53 dokazali su da ima ulogu tumorskog supresora. Od 1989. godine brojne publikacije pokazale su kako je mutacija u genu *TP53* najčešća genska promjena u raku kod ljudi. p53 je transkripcijski faktor koji u stanici ima veoma kompleksnu ulogu u održavanju genetske stabilnosti - određuje sudbinu stanice nakon izlaganja stresu zaustavljajući stanični ciklus, sudjelujući u popravku DNA, potičući programiranu staničnu smrt (apoptozu) ili stanično starenje (senescenciju). Upravo zbog ovih važnih uloga nazvan je „čuvarom genoma“ (Lane, 1992).

Sredinom 90-tih godina, otkrivena su dva srodnika p53 - p63 i p73. Oni međusobno dijele veliku sličnost u strukturi te pokazuju sposobnost prepoznavanja i vezanja na kanonske elemente koje prepoznaje protein p53, čime se u svojoj ulozi djelomično preklapaju s proteinom p53 (Yang i sur., 1998; Kaghad i sur., 1997).

### 1.1.2. Geni obitelji p53 imaju složenu građu

Gen za protein p53, *TP53*, smješten je na kromosomu 17 i građen je od 12 eksona, 11 klasičnih eksona i jednog alternativnog ( $9\beta/9\gamma$ ) (Joruiž i Bourdon, 2016). Geni za proteine p63 i p73, *TP63* i *TP73*, smješteni su na kromosomu 3, odnosno 1 i građeni su od 16, odnosno 15 eksona (Yang i sur., 1998; Kaghad i sur., 1997). Gen *TP63* sastoji se od 14 klasičnih eksona i dva alternativna (3' i 10'), dok se gen *TP73* sastoji od jednog alternativnog eksona (3') (Murray-Zmijewski i sur., 2006). Na slici 1, prikazana je struktura gena *TP53*, *TP63* i *TP73*. Alternativni eksoni istaknuti su u žutoj boji.

Geni iz ove obitelji, osim klasičnog promotora (P1), sadrže i unutarnji promotor (P2), smješten u intronu 3 gena *TP73* i *TP63* (Moll i Slade, 2004), odnosno intronu 4 gena *TP53* (Bourdon i sur., 2005). Oba promotora su funkcionalna, te stoga prepisuju dvije mRNA koje kodiraju za različite izoforme. Prepisivanjem s promotora P1 nastaju izoforme s transaktivacijskim područjem (p53, TAp63 i TAp73), dok prepisivanjem s unutarnjeg promotora P2 nastaju izoforme bez transaktivacijskog područja ( $\Delta 133p53$ ,  $\Delta Np63$ ,  $\Delta Np73$ ).

Izoforme koje nastaju prepisivanjem s unutarnjeg promotora P2 ( $\Delta Np63$  i  $\Delta Np73$ ) po funkciji su suprotne izoformama koje nastaju prepisivanjem s klasičnog promotora P1 (TAp63 i TAp73), te imaju dominantno-negativni utjecaj na njihovu aktivnost i mogu izravno inaktivirati njihove ciljane gene. S obzirom da izoforme TAp63 i TAp73 djeluju kao tumor-supresori, a njihove kraće forme  $\Delta Np63$  i  $\Delta Np73$  kao onkogeni, za gene iz ove obitelji možemo reći da imaju strukturu „dva gena u jednom” (Slade i sur., 2010). S druge strane, za izoforme p53 to ne možemo tvrditi jer njihova uloga primarno ovisi o vrsti stanica i tkiva u kojem se nalaze (Bourdon i sur., 2005).

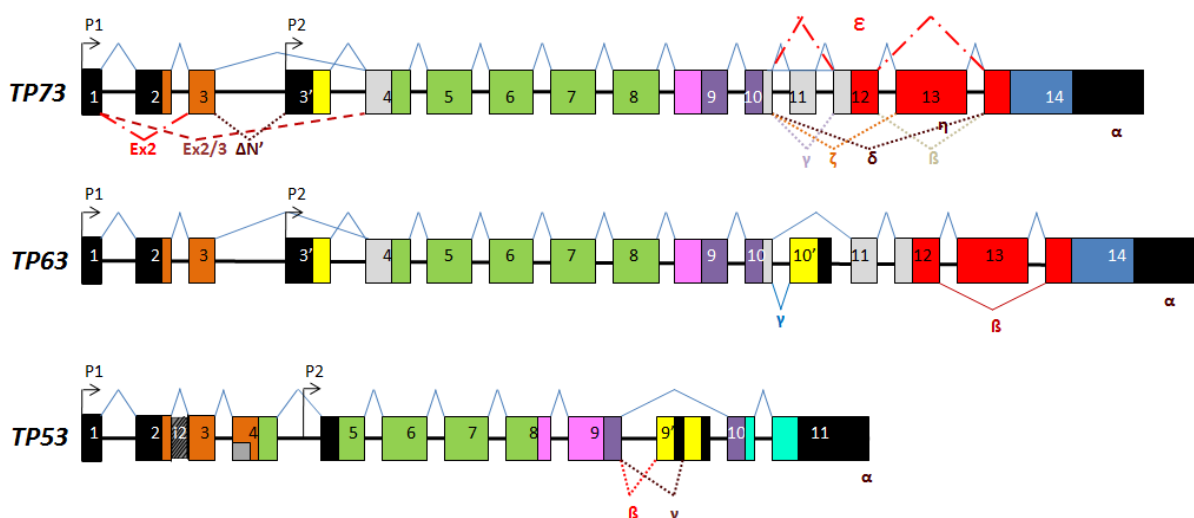
Geni *TP53*, *TP63* i *TP73* imaju složenu strukturu. Osim unutarnjeg promotora oni imaju mogućnost alternativnog prekrajanja i posjeduju alternativna mjesta početka translacije čime nastaju mnogobrojne proteinske izoforme.

Većina alternativnog prekrajanja događa se na 3' kraju molekule mRNA te nastaju proteinske izoforme koje se razlikuju na svome karboksi kraju. Tako zbog alternativnog prekrajanja na 3' kraju, geni *TP53* i *TP63* kodiraju tri mRNA ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) (Bourdon i sur., 2005; Yang i sur., 1998), dok gen *TP73* kodira sedam mRNA ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) (Kaghad i sur., 1997; De Laurenzi i sur., 1998; De Laurenzi i sur., 1999).

Osim alternativnog prekrajanja na 3' kraju, geni *TP53* i *TP73* imaju mogućnost alternativnog prekrajanja na 5' kraju molekule mRNA. Tako gen *TP73* kodira izoforme: Ex2 (kojima nedostaje ekson 2), Ex2/3 (kojima nedostaju eksoni 2 i 3) i  $\Delta N'$  (koje uključuju ekson 3') (Moll i Slade 2004; Stiewe i sur., 2002a). *TP53* prepisuje mRNA koje izrezuju/zadržavaju intron 2 te sukladno tome kodiraju p53 ili  $\Delta 40p53$  izoforme (Joruz i Bourdon, 2016).

Nadalje, gen *TP53* posjeduje i alternativna mjesta početka translacije, uslijed kojeg nastaju izoforme  $\Delta 40p53$  i  $\Delta 160p53$  (Joruz i Bourdon, 2016).

Dakle, s gena *TP63* prepisuje se 6 različitih molekula mRNA koje kodiraju za 6 proteinskih izoformi (TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$ , TAp63 $\gamma$ ,  $\Delta Np63\alpha$ ,  $\Delta Np63\beta$ ,  $\Delta Np63\gamma$ ), s gena *TP73* 35 molekula mRNA koje kodiraju za 28 proteinskih izoformi (TAp73 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ; Ex2p73 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ; Ex2/3p73 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ;  $\Delta N'p73\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ;  $\Delta Np73\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ), dok se s gena *TP53* prepisuje 9 molekula mRNA koje kodiraju za 12 proteinskih izoformi (p53 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ;  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ;  $\Delta 133p53\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ;  $\Delta 160p53\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Murray-Zmijewski i sur., 2006; Joruz i Bourdon, 2016).

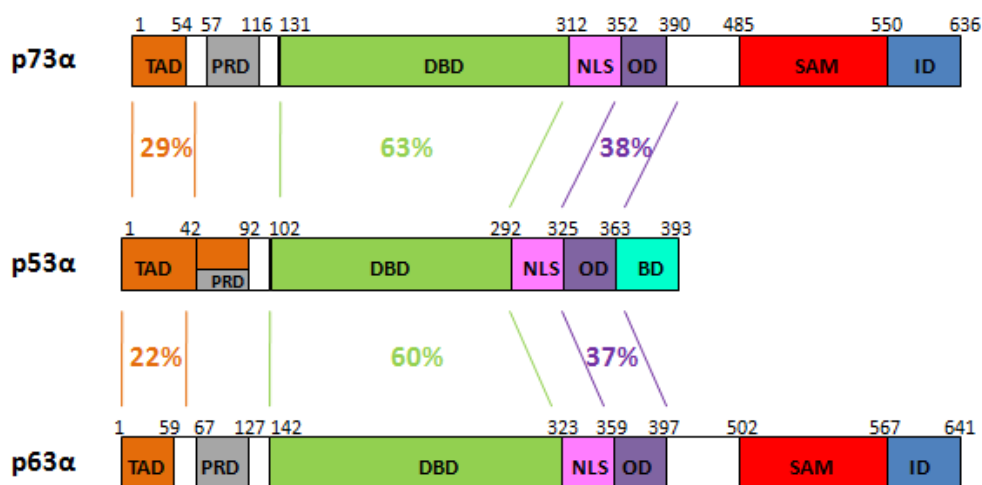


**Slika 1: Struktura gena *TP53*, *TP63* i *TP73*.** Crni pravokutnici predstavljaju nekodirajuće eksone, dok pravokutnici u bojama predstavljaju kodirajuće eksone. Narančastom bojom označeni su eksoni koji kodiraju transaktivacijsko područje, zelenom bojom eksoni koji kodiraju DNA-vezno područje, bojom ciklame označeni su eksoni koji kodiraju za signal za smještanje u jezgru, ljubičastom bojom eksoni koji kodiraju oligomerizacijsko područje, crvenom bojom eksoni koji kodiraju područje sa sterilnim alfa-motivom, plavom bojom eksoni koji kodiraju za inhibitorno područje, dok su tirkiznom bojom označeni eksoni koji kodiraju za bazno područje. Geni *TP73*, *TP63* i *TP53* sadrže, uz klasične, i alternativne eksone (3' kod gena *TP73*; 3' i 10' kod gena *TP63*, te 9 $\beta/\gamma$  kod gena *TP53*) koji su prikazani u žutoj boji. Nadalje, ovi geni posjeduju mogućnost alternativnog prekrajanja na 5' i na 3' kraju, te alternativno mjesto početka translacije čime kodiraju za mnogobrojne izoforme. Tako gen *TP73* kodira za 35 molekula mRNA koje kodiraju za 28 izoformi proteina p73. Gen *TP63* kodira za 6 molekula mRNA koje kodiraju za 6 izoformi proteina p63, dok gen *TP53* kodira za 9 molekula mRNA koje kodiraju za 12 izoformi proteina p53.

### 1.1.3. Proteini obitelji p53 imaju sličnu strukturu

Sva tri člana obitelji proteina p53 su transkripcijski faktori koji sadrže tri područja karakteristična za transkripcijske faktore: transaktivacijsko područje (TAD, od engl. *transactivation domain*) na amino kraju, DNA-vezno područje (DBD, od engl. *DNA-binding domain*) u sredini, dok se na karboksi kraju nalazi oligomerizacijsko područje (OD, od engl. *oligomerization domain*). U tim područjima navedeni proteini posjeduju visoki postotak sličnosti. Između proteina p53 i p63, sličnost u transaktivacijskom području iznosi 22%, u DNA-veznom području 60%, a u oligomerizacijskom području 37%. Između proteina p53 i p73 sličnost u transaktivacijskom području iznosi 29%, u DNA-veznom području 63%, a u oligomerizacijskom području 38% (Moll i Slade, 2004).

Nadalje, ovi proteini sadrže područje bogato prolinom (PRD, od engl. *proline-rich domain*) koje se nalazi između TAD i DBD, te signalno područje za smještanje u jezgru (NLS, od engl. *nuclear localization signal*) koje se nalazi između DBD i OD (Bénard i sur., 2003; Slade i sur., 2010). Na slici 2 prikazana je struktura proteina p53, p63 i p73.



**Slika 2: Usporedna struktura proteina p53, p63 i p73.** Sva tri proteina građena su od transaktivacijskog područja (TAD, označenog narančastom bojom), područja bogatog prolinom (PRD, označenog sivom bojom), DNA-veznog područja (DBD, označenog zelenom bojom), signalnog područja za smještanje u jezgru (NLS, označenog bojom ciklame), oligomerizacijskog područja (OD, označenog ljubičastom bojom). Proteini p63 i p73 na karboksi kraju sadrže područja sa sterilnim  $\alpha$ -motivom (SAM, označenog crvenom bojom) i inhibitoryno područje (ID, označeno plavom bojom), dok protein p53 ima bazno područje (BD, označeno tirkiznom bojom). Prikazan je i postotak identičnosti slijeda između određenih područja proteina.

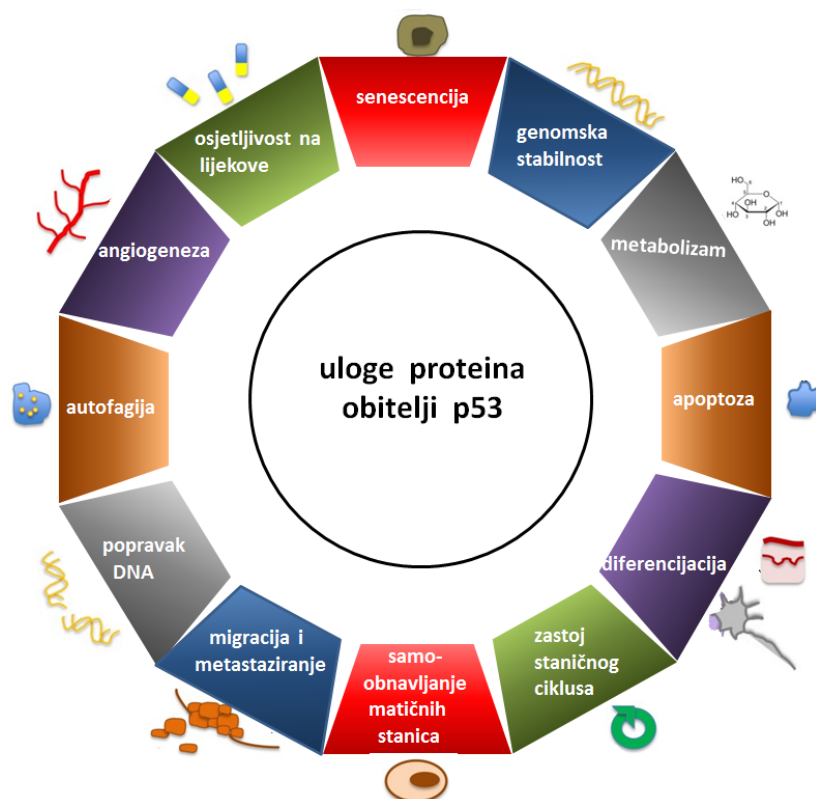
Međutim, između proteina p53, p63 i p73 postoje razlike. Naime, na amino kraju protein p53 ima dva transaktivacijska područja, dok proteini p63 i p73 imaju samo jedno (Bénard i sur., 2003; Slade i sur., 2010). Nadalje, na karboksi kraju proteini p63 i p73 imaju područje sa sterilnim  $\alpha$ -motivom (SAM, od engl. *sterile  $\alpha$  motif*) i inhibitorno područje (ID, od engl. *inhibitory domain*), dok protein p53 ima bazno područje (BD, od engl. *basic domain*) (Scoumanne i sur., 2005).

#### 1.1.4. Proteini obitelji p53 imaju mnogobrojne uloge u stanici

Protein p53 ima središnje mjesto u tumorigenezi. Kao tumor-supresorski protein prisutan je u stanicama u bazalnoj razini te kontrolira stanični odgovor na stres (Kastan i sur., 1992). Njegova se razina u prisustvu ultraljubičastog ili ionizirajućeg zračenja, hipoksije, karcinogena ili oksidativnog stresa povećava. Ovisno o intenzitetu i vrsti nastalog oštećenja, određuje sudbinu stanice. Mehanizmi koji bi objasnili način na koji stanica donosi odluku o smrti ili preživljavanju još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.

Proteini p63 i p73 imaju važnu i jedinstvenu ulogu u razvoju. Protein p63 uključen je u diferencijaciju i razvoj kože (Yang i sur., 1998), dok je protein p73 uključen u neurogenezu (Kaghad i sur., 1997). Osim ovih jedinstvenih funkcija, proteini p63 i p73 imaju funkcije koje mogu biti bilo sinergističke bilo antagonističke prirode u odnosu na protein p53 (Moll i Slade, 2004). Tako izoforme TA (TAp63 i TAp73) zbog visoke homologije s proteinom p53 mogu potaknuti zastoj staničnog ciklusa, apoptozu i senescenciju (Yang i sur., 1998; Kaghad i sur., 1997; Moll i Slade, 2004; Gressner i sur., 2005; Keyes i sur., 2005; Guo i sur., 2009). S druge strane, izoforme  $\Delta N$  ( $\Delta Np63$ ,  $\Delta Np73$ ,  $\Delta 133p53$ ) ponašaju se kao transkripcijski represori koji inhibiraju apoptozu, potičući tako imortalizaciju (Patturajan i sur., 2002; Stiewe i sur., 2002a; Moll i Slade, 2004; Bourdon i sur., 2005; Aoubala i sur., 2011).

Osim uloge u tumorigenezi, proteini p53, p63 i p73 imaju uloge i u ostalim procesima u stanici kao što su metabolizam glukoze i lipida te diferencijacija stanica (Pflaum i sur., 2014).



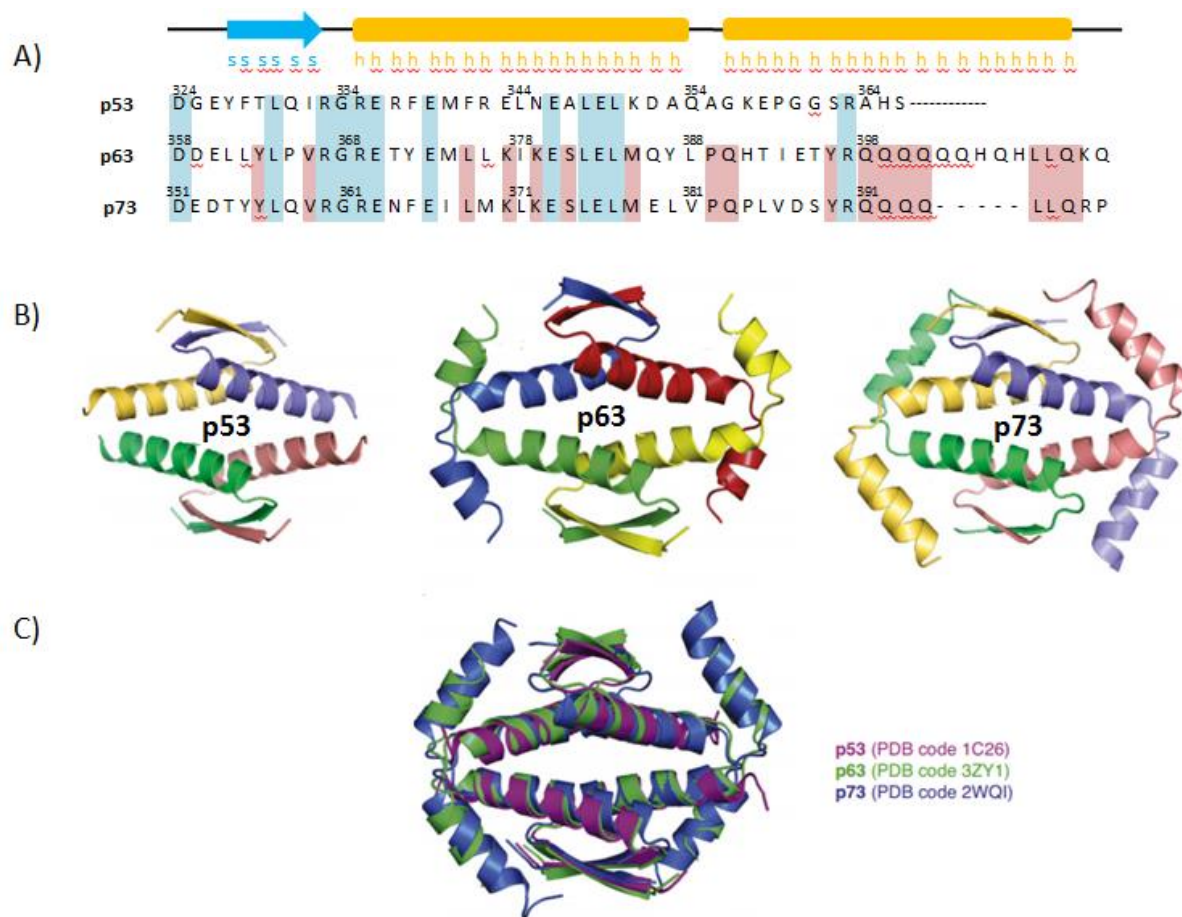
**Slika 3: Uloge proteina obitelji p53.** Proteini p53, p63 i p73 dijele mnogobrojne uloge, prvenstveno u zaustavljanju staničnog ciklusa, poticanju apoptoze i senescencije te su na različite načine uključeni i u druge stanične procese, autofagiju, angiogenezu, metabolizam, migraciju, metastaziranje. Osim ovih zajedničkih uloga, oni isto tako imaju uloge koje su svojstvene samo njima. Tako je p63 važan za diferencijaciju kože, dok je p73 odgovoran za pravilnu neurogenezu. Preuzeto i prilagođeno od Pflaum i suradnici (2014).

### 1.1.5. Proteini obitelji p53 tvore tetramere

Proteini obitelji p53, moraju biti u formi tetramera da bi bili aktivni. Za tetramerizaciju je odgovorno oligomerizacijsko područje - slijed od 40-tak odnosno 50-tak aminokiselina. Oligomerizacijsko područje proteina p53 sadrži  $\beta$ -lanac i  $\alpha$ -zavojnicu, dok oligomerizacijsko područje proteina p63 i p73 sadrži  $\beta$ -lanac i dvije  $\alpha$ -zavojnice (slika 4A) (Joerger i sur., 2014; Natan i Joerger, 2012)

Samu srž tetramera čine četiri  $\alpha$ -zavojnice koje su u  $D_2$ -simetriji (povezani kao dimeri dimera), a stabiliziraju ih  $\beta$ -lanci kod proteina p53, te  $\beta$ -lanci i dodatne  $\alpha$ -zavojnice kod proteina p63 i p73 (slika 4B) (Joerger i sur., 2014; Natan i Joerger, 2012). Kristalne strukture tetramerizacijske okosnice proteina p53, p63 i p73 vrlo su slične, što omogućuje stvaranje heterotetramera između ovih proteina.

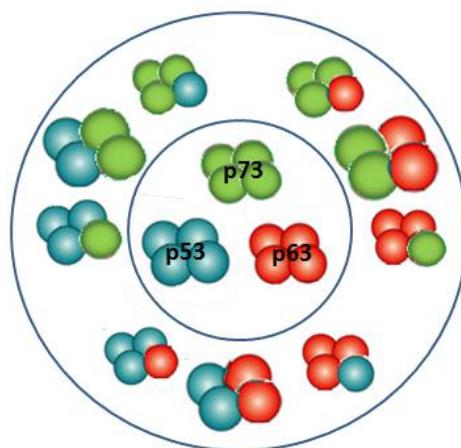




**Slika 4: Tetramerizacijsko područje proteina p53, p63 i p73.** (A) Svrnjenje oligomerizacijskog područja proteina p53, p63 i p73. Evolucijski očuvane aminokiseline istaknute su plavom bojom (kod svih članova), odnosno crvenom bojom (samo u p63 i p73). Elementi sekundarnih struktura napisani su i skicirani iznad svrnjenja (s –  $\beta$ -lanac ; h –  $\alpha$ -zavojnica). (B) Tetramerne strukture proteina p53, p63 i p73. Svaka podjedinica proteina prikazana je drugom bojom. (C) Superpozicija oligomerizacijskog područja proteina p53, p63 i p73. Preuzeto i prilagođeno od Joerger i suradnika (2014), te Natan i Joerger (2012).

Joerger i suradnici (2014) pokazali su kako *in vitro* proteini p63 i p73 mogu vrlo djelotvorno stvarati heterotetramere svih kombinacija (3:1, 2:2, 1:3), od kojih su najstabilniji heterotetrameri 2:2. S druge strane, protein p53 nije stvarao heterotetramere s proteinima p63 i p73.

Međutim, u uvjetima *in vivo* pokazano je da proteini ove obitelji aktivno stvaraju komplekse (Nakagawa i sur., 2002; Zaika i sur., 2002; Flores i sur., 2002; Matin i sur., 2013). Ti kompleksi imaju izuzetno važnu ulogu jer moduliraju odgovor proteina p53 na stanični stres (Flores i sur., 2002; Bourdon i sur., 2005; Murray-Zmijewski i sur., 2006; Zorić i sur., 2013; Marcel i sur., 2014).



**Slika 5: Homotetrameri i heterotetrameri obitelji proteina p53.** Članovi obitelji proteina p53 moraju se povezati u tetramere da bi bili aktivni transkripcijski faktori. Tetramerizacija se odvija preko oligomerizacijskog područja smještenog na karboski kraju proteina. Proteini p53, p63 i p73 dijele visok stupanj sličnosti u oligomerizacijskom području (oko 30%), te mogu međusobno stvarati heterotetramere svih kombinacija, od kojih su najstabilniji heterotetrameri kombinacije 2:2.

## 1.2. Obitelj proteina NME

Geni obitelji *NME* kodiraju za nukleozid difosfat kinaznu obitelj proteina NME/NDPK. Do danas je poznato 10 gena/proteina NME koji su svrstani u dvije skupine. Prva skupina obuhvaća gene/proteine NME1-NME4 koji imaju enzimatsku aktivnost, dok druga skupina obuhvaća gene/proteine bez enzimatske aktivnosti (Desvignes i sur., 2009).

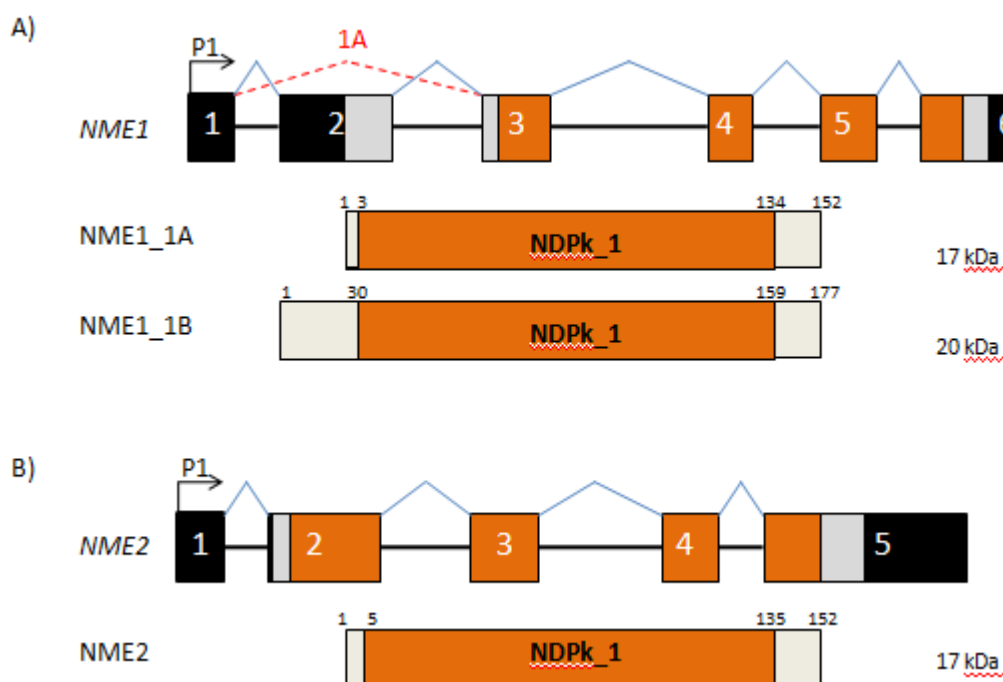
Najbolje istraženi članovi ove obitelji su NME1 i NME2. Gen/protein NME1 otkiven je 1988. godine (Steege i sur., 1988). Nekoliko godina kasnije otkriven je njegov homolog NME2 s kojim dijeli 88% sličnosti u aminokiselinskom slijedu (Stahl i sur., 1991).

NME1 i NME2 imaju mnogobrojne uloge u stanici. NME1 ima ulogu supresora metastaziranja (Steege i sur., 1988), dok NME2 ima ulogu transkripcijskog faktora za gen *c-myc* (Postel i sur., 1993). Nadalje, oni se u stanici nalaze u obliku homo ili heteroheksamera (NME1<sub>6</sub>, NME1<sub>1</sub>NME2<sub>5</sub> ... NME1<sub>5</sub>NME2<sub>1</sub>, NME2<sub>6</sub>) i kao takvi tvore enzim nukleozid-difosfat kinazu koja je zadužena za održavanje količine dNDP-a u stanici (Lacombe i sur., 2000). Osim ove važne uloge, proteini NME1 i NME2 imaju i protein kinaznu aktivnost te DNaznu aktivnost. Nadalje, oni imaju ulogu u mnogobrojnim staničnim procesima kao što su

razvoj, diferencijacija, proliferacija, endocitoza, apoptoza, popravak DNA, te regulacija transkripcije (Bosnar i sur., 2009).

Gen *NME1* građen je od 6 eksona i kodira za protein NME1, dok je gen *NME2* građen od 5 eksona i kodira za protein NME2. Oba proteina sadrže nukleozid difosfatno područje (NDPk\_1) odgovorno za prijenos fosfatne skupine s dNDP-a na dNTP.

Dok je nađeno da protein NME1 ima dvije izoforme (NME1\_A i NME1\_B), za protein NME2 nađena je do sada samo jedna. Protein NME1\_A prihvaćen je kao kanonski protein od 152 aminokiseline, dok je NME1\_B prihvaćen kao izoforma koja sadrži dodatnih 25 aminokiselina na N-kraju (Ni i sur., 2003). Na slici 6 prikazana je struktura gena i proteina NME1 i NME2.



**Slika 6: Geni *NME1* i *NME2* i njihovi proteini.** (A) Gen *NME1* građen je od 6 eksona, dok je (B) gen *NME2* građen od 5 eksona. Crni pravokutnici prikazuju nekodirajući dio sekvence, dok su kodirajući dijelovi prikazani u bojama. Proteini NME1 i NME2 sastoje se od nukleozid difosfatnog područja (NDPk\_1, narančasta boja). smještenog između 3./30. i 134./159. aminokiseline kod proteina NME1, odnosno između 5. i 135. aminokiseline kod proteina NME2. Protein NME1 ima dvije izoforme: NME\_1A i NME\_1B, dok protein NME2 ima samo jednu.

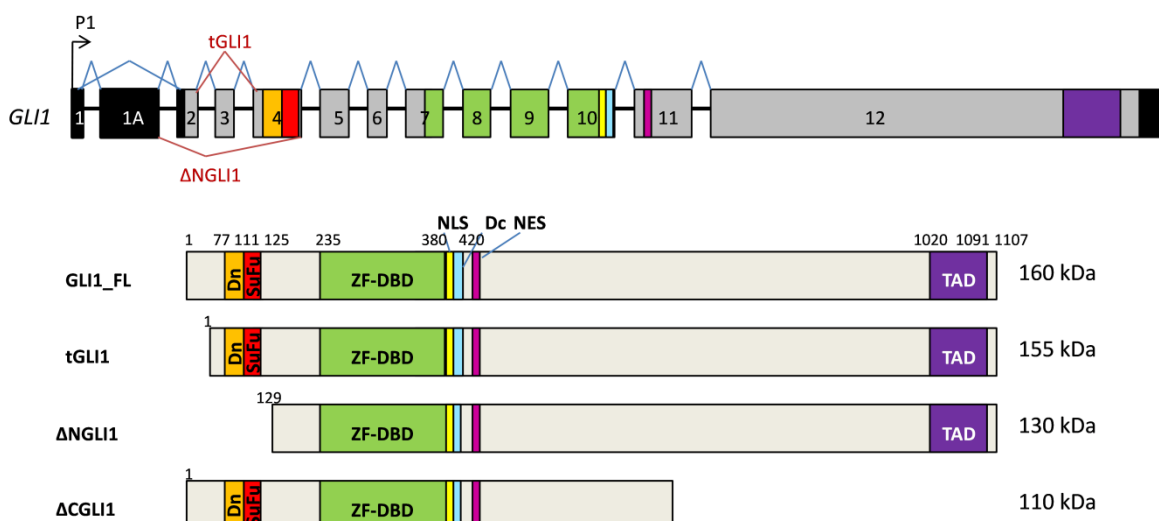
### 1.3. Obitelj proteina GLI

Geni/proteini obitelji GLI dio su signalnog puta Hedgehog-GLI. GLI1 otkriven je 1987. godine (Kinzler i sur., 1987), dok su GLI2 i GLI3 otkriveni godinu dana kasnije (Ruppert i sur., 1988).

Signalni put Hedgehog-GLI ima važnu ulogu tijekom embrionalnog razvoja, a u odraslom organizmu većinom je neaktivan ili slabo aktivan, izuzev matičnih i progenitorskih stanica (Ruiz i Altaba i sur., 2007). Ovaj signalni put povezan je i s nastankom sporadičnih tumora, posebice Gorlinovog sindroma (sindroma nevoidnih bazocelularnih karcinoma) (Hahn i sur., 1996; Levanat i sur., 1996). Transkripcijski faktori GLI potiču ekspresiju mnogobrojnih ciljnih gena u stanici kao što su geni uključeni u stanični ciklus, proliferaciju, preživljenje, samoobnavljanje, angiogenezu, adheziju i proces epitelijalno-mezenhimalne tranzicije (Levanat i sur., 2008).

Gen *GLI1* građen je od 12 eksona i kodira za četiri do sada poznate izoforme koje nastaju alternativnim prekrajanjem. Na slici 7 prikazan je gen *GLI1* i proteinske izoforme za koje kodira. Tako postoje izoforme pune duljine (*GLI1\_FL* ili *GLI1\_160*), izoforme kojima nedostaje ekson 3 (*tGLI1*), izoforme kojima nedostaju eksoni 2, 3 i veći dio eksona 4 ( $\Delta$ *NGLI1* ili *GLI1\_130*), te izoforme kojima nedostaje ekson 12 (*C'* $\Delta$ *GLI1* ili *GLI1\_110*) (Ruiz i Altaba, 1999; Carpenter i Lo, 2012; Amable i sur., 2014).

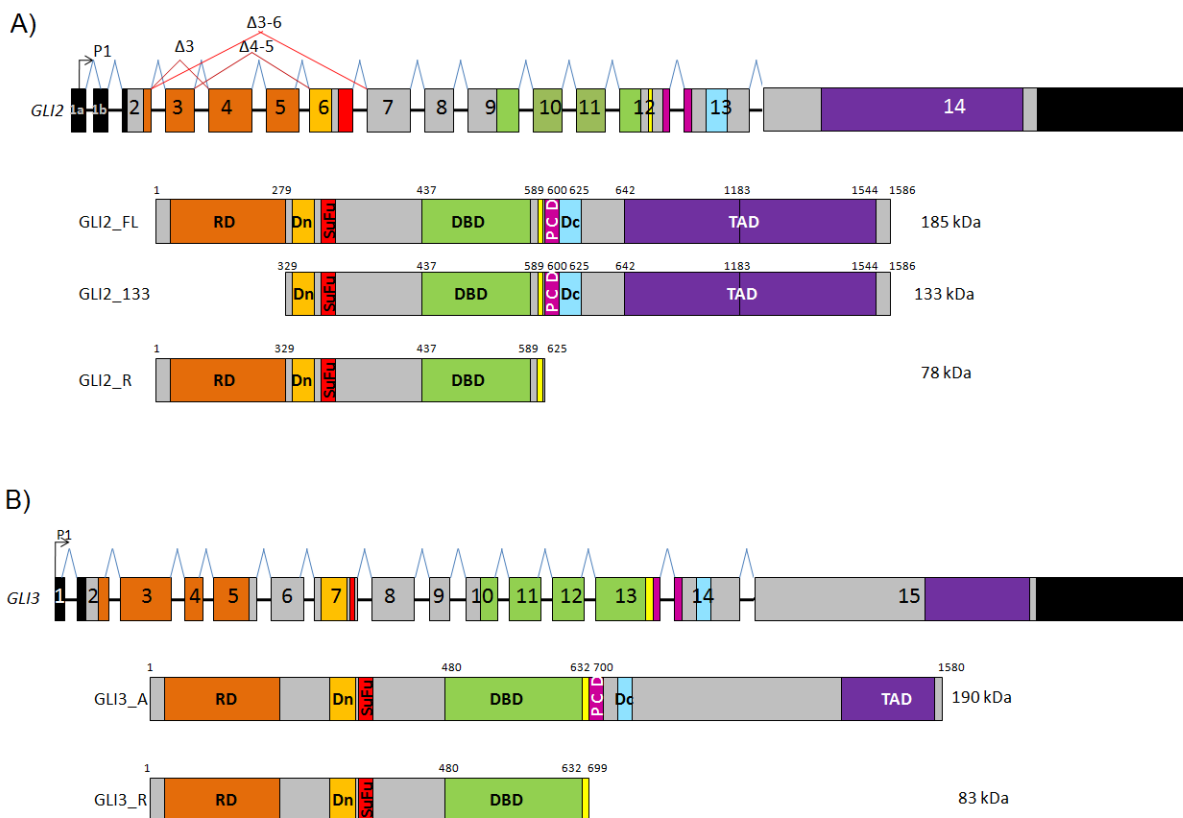
Geni *GLI2* i *GLI3* građeni su od 14, to jest 15 eksona, te kodiraju za proteine GLI2 odnosno GLI3 koji međusobno dijele 44% sličnosti u aminokiselinskom slijedu (Pan i sur., 2006). Gen *GLI2* ima mogućnost alternativnog prekrajanja, kao i mnogobrojna alternativna mjesta početka translacije čime nastaju brojne izoforme. Većina izoformi ima preuranjene stop kodone, te su stoga nefunkcionalne (Speek i sur., 2006). Međutim, izoforma koja nastaje prepisivanjem s alternativnog mjesta početka translacije u eksonu 5 veoma je zastupljena i vrlo je jaki transkripcijski aktivator. Do prije desetak godina upravo se ona smatrala kanonskim proteinom GLI2 (Sadam i sur., 2016). Gen *GLI3* najmanje je istražen i za njega se ne zna ima li mogućnost alternativnog prekrajanja.



**Slika 7: Gen *GLI1* i njegove proteinske izoforme.** Gen *GLI1* građen je od 12 eksona. Crni pravokutnici prikazuju nekodirajući dio sekvence, dok su kodirajući dijelovi sekvence prikazani u bojama. Tamno žutom bojom prikazano je područje Degron (Dn), crvenom bojom Sufu-vezno mjesto (SuFu), zelenom bojom DNA-vezno područje (ZF-DBD), žutom bojom područje sa signalom za smještaj u jezgru (NLS), svjetlo plavom bojom područje Degron (Dc), svjetlo ljubičastom bojom područje sa signalom za izlazak iz jezgre (NES), dok je ljubičastom bojom prikazano transaktivacijsko područje (TAD). Gen *GLI1* kodira za četiri do sada poznate izoforme koje nastaju alternativnim prekrajanjem: *GLI1\_FL* ili *GLI1\_160*, *tGLI1*,  $\Delta$ *NGLI1* ili *GLI1\_130* i  $\Delta$ *CGLI1* ili *GLI1\_110*.

Za razliku od proteina *GLI1*, proteini *GLI2* i *GLI3* imaju mogućnost proteolitičkog cijepanja čime nastaju njihove represorske forme. Protein *GLI2* se proteolitički cijepa između 600. i 640. aminokiseline pa nastaje represorska forma proteina *GLI2\_R* (slika 8A), dok se protein *GLI3* proteolitički cijepa između 700. i 740. aminokiseline, te tako nastaje represorska forma proteina *GLI3\_R* (slika 8B) (Sasaki i sur., 1999; Pan i sur., 2006).

Protein *GLI3* je transkripcijski represor jer se većina proteina proteolitički procesira u formu *GLI3\_R* u uvjetima kada signalni put nije aktivan. Međutim, pokazano je da on može imati i slabu aktivatorsku ulogu. S druge strane, protein *GLI2* je prvi transkripcijski aktivator u uvjetima kada je signalni put aktivan. On dalje aktivira transkripciju *GLI1*, te oni zajedno aktiviraju razne nizvodne gene (Pan i sur., 2006).



**Slika 8: Geni *GLI2* i *GLI3* i njihove proteinske izoforme.** (A) Gen *GLI2* građen je od 14 eksona, dok je gen (B) *GLI3* građen od 15. Crni pravokutnici prikazuju nekodirajući dio sekvence, dok su kodirajući dijelovi sekvence prikazani u bojama. Narančastom bojom prikazano je represorsko područje (RD), tamno žutom bojom područje Degron (Dn), crvenom bojom SuFu-vezno mjesto (SuFu), zelenom bojom DNA-vezno područje (DBD), žutom bojom područje sa signalom za smještaj u jezgru (NLS), bojom ciklame područje proteolitičkog cijepanja (PCD), svjetlo plavom bojom područje Degron (Dc), dok je ljubičastom bojom prikazano transaktivacijsko područje (TAD). Proteini *GLI2* i *GLI3* pune duljine su transkripcijski aktivatori, a kada se proteolitički cijepaju nastaju njihove represorske forme (*GLI2\_R* i *GLI3\_R*) koje su transkripcijski inhibitori.

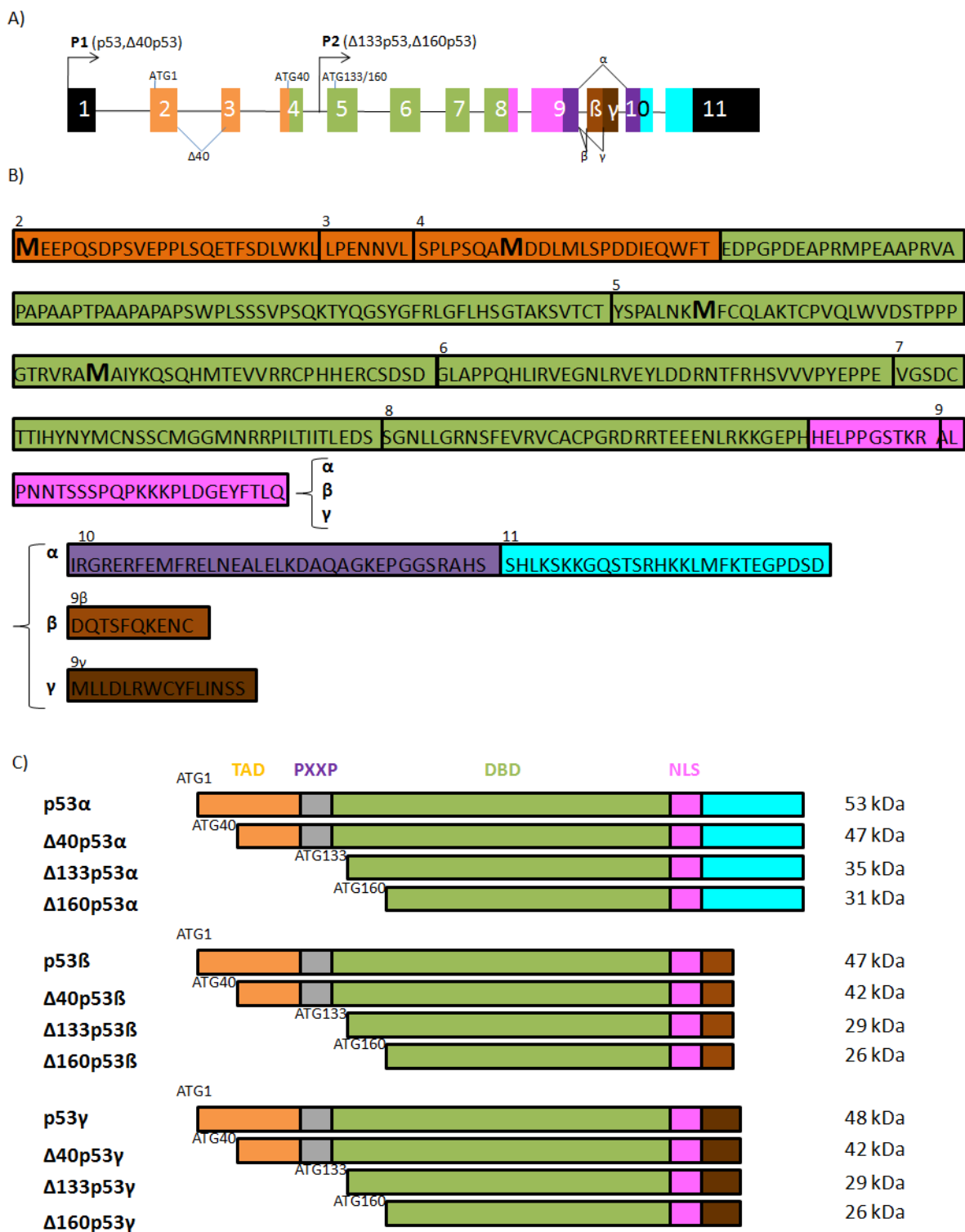
## 1.4. Funkcionalne interakcije tumor supresorskog proteina p53 s izoformama p53/p73, te proteinima iz obitelji NME i GLI

Tumor supresorski protein p53 odgovoran je za održavanje homeostaze u stanici. U normalnim uvjetima njegova ekspresija je niska i pod regulacijom proteina MDM2. Međutim pod utjecajem oštećenja njegova razina raste, on se aktivira i stabilizira te kao transkripcijski faktor sjeda na promotore gena koji su zaduženi za zastoj staničnog ciklusa, popravak oštećenja DNA, te apoptozu ili senescenciju, ovisno o količini nastalog oštećenja (Lane, 1992).

### 1.4.1. Interakcije proteina p53 $\alpha$ i izoformi p53 male molekulske mase

Godine 2005. otkriveno je da protein p53 sadrži brojne izoforme. Zbog prisutnosti alternativnog eksona ( $9\beta/\gamma$ ), unutarnjeg promotora (P2), mogućnosti alternativnog prekrajanja na 3' i 5' kraju, te alternativnog mjesta početka translacije do danas je poznato 12 izoformi: p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 40p53\beta$ ,  $\Delta 40p53\gamma$ ,  $\Delta 133p53\alpha$ ,  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53\gamma$ ,  $\Delta 160p53\alpha$ ,  $\Delta 160p53\beta$  i  $\Delta 160p53\gamma$  (Joruz i Bourdon, 2016).

Gledajući s N-kraja, razlikujemo izoforme pune duljine, tj. one koje sadrže cjelovito transaktivacijsko područje (p53 $\alpha$ , p53 $\beta$  i p53 $\gamma$ ) i izoforme  $\Delta$ TA kojima nedostaje dio ili cijelo transaktivacijsko područje ( $\Delta 40$ ,  $\Delta 133$  i  $\Delta 160$ ). Izoformama  $\Delta 40$  nedostaje prvih 39 aminokiselina, dok izoformama  $\Delta 133$  i  $\Delta 160$  nedostaje prvih 132, odnosno 159 aminokiselina. Gledajući s C-kraja razlikujemo alfa, beta i gama izoforme. Na slici 9 prikazane su proteinske izoforme p53.



**Slika 9: Gen TP53 i njegove proteinske izoforme.** (A) Gen TP53 ima složenu strukturu, posjeduje alternativni ekson 9β/γ, ima mogućnost alternativnog prekranja i posjeduje alternativna mjesta početka translacije. (B) Aminokiselinski slijed proteina p53. U lijevom kutu označeni su brojevi eksona. (C) Izoforme proteina p53.



Protein p53 $\alpha$  stupa u interakciju sa svojim izoformama i tako određuje sudbinu stanice. Interakcije mogu biti izravne proteinske ili regulacijske.

Bourdon i suradnici (2005) pokazali su da endogena izoforma p53 $\beta$  ko-imunoprecipitira endogenu p53 $\alpha$  izoformu u stanicama raka dojke MCF7 (p53<sup>wt</sup>), dokazujući kako te izoforme formiraju proteinski kompleks. Međutim, Graupner i suradnici (2009) pokazali su da se kompleks između p53 $\beta$  i p53 $\alpha$ , te između p53 $\gamma$  i p53 $\alpha$  ne može ostvariti izravnim putem, što je u skladu sa činjenicom jer niti p53 $\beta$  niti p53 $\gamma$  nemaju oligomerizacijsko područje. Ipak, Marcel i suradnici (2014) potvrdili su u stanicama raka dojke da su izravne proteinske interakcije između ovih proteina ipak moguće te da je za interakcije između p53 $\beta$  i p53 $\alpha$ , te između p53 $\gamma$  i p53 $\alpha$  potrebna prisutnost konsenzusne sekvence za p53 (TATA box) ukazujući time da je kompleks p53 $\beta$ /p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$ /p53 $\alpha$  ovisan o promotoru i najvjerojatnije nije tetramer. Obje izoforme, p53 $\beta$  i p53 $\gamma$ , moduliraju stanični odgovor proteina p53 $\alpha$  ovisno o vrsti stanica i tkiva. Tako u stanicama fibroblasta kompleks p53 $\alpha$ /p53 $\beta$  potiče senescenciju (Fujita i sur., 2009), u stanicama raka dojke potiče apoptozu (Marcel i sur., 2014), a u stanicama melanoma potiče zastoj staničnog ciklusa i apoptozu (Avery-Kiejda i sur., 2008). Sama izoforma p53 $\beta$  u stanicama melanoma bez p53 nema transkripcijsku aktivnost (Avery-Kiejda i sur., 2008).

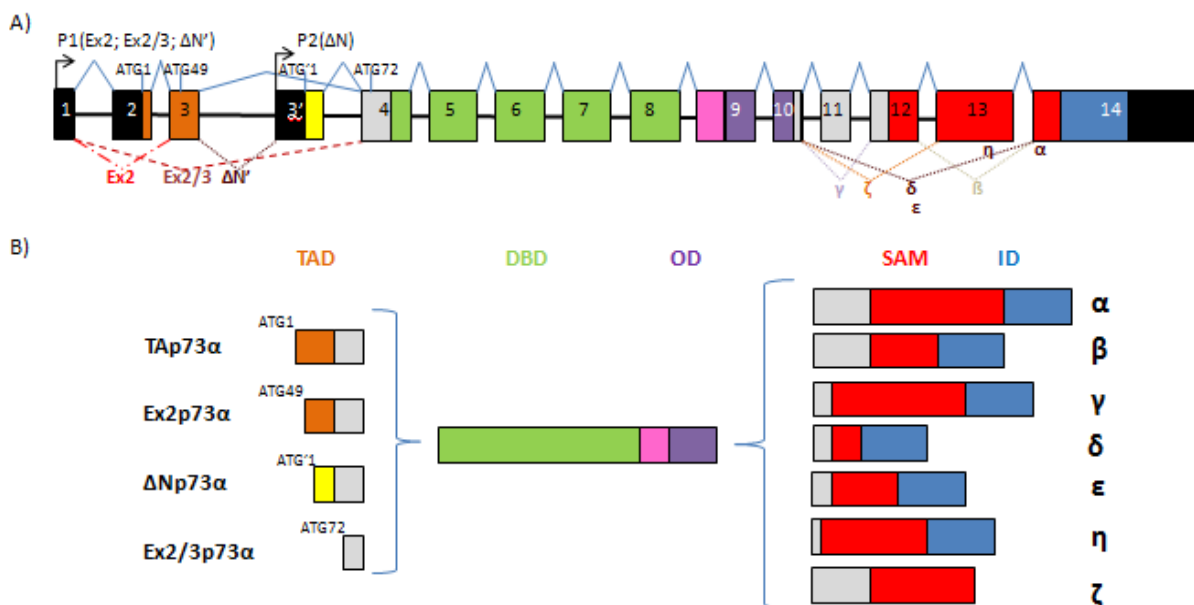
Izoforma  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  ne sadrži cjelovito već krnje transaktivacijsko područje. Ova izoforma ko-imunoprecipitira s p53 $\alpha$ , kako *in vitro* tako i *in vivo* potvrđujući postojanje izravne interakcije između njih, najvjerojatnije u obliku heterotetramera. Ovisno o vrsti stanica i tkiva, te količini prisutne izoforme u odnosu na protein p53 $\alpha$ , ona modulira stanični odgovor djelujući kao inhibitor transkripcije nizvodnih gena zaduženih za zastoj staničnog ciklusa (Avery-Kiejda i sur., 2008; Hafsi i sur., 2013; Takahashi i sur., 2014). Sama izoforma  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  nema transkripcijsku aktivnost (Avery-Kiejda i sur., 2008).

Izoforma  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  ne sadrži transaktivacijsko područje i dio DNA-veznog područja.  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  ko-imunoprecipitira s p53 $\alpha$  potvrđujući postojanje izravnog proteinskog kompleksa (Aoubala i sur., 2011). Nadalje,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  modulira stanični odgovor proteina p53 $\alpha$  ovisno o vrsti stanica. Aoubala i suradnici (2011) su u nekoliko staničnih linija pokazali da  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  inhibira apoptozu i zastoj u fazi G1 staničnog ciklusa u stanicama raka dojke, dok su Bernard i suradnici (2013) pokazali da  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  stimuliraju angiogenezu u glioblastomima.

Između proteina p53α i njegovih izoformi, osim izravnih fizičkih interakcija postoje i regulacijske interakcije. Naime, kao odgovor na stres, protein p53α se veže na svoj unutarnji promotor (P2) aktivirajući tako transkripciju Δ133p53 izoformi. Zauzvrat, Δ133p53 izoforme se vežu na promotor P1 inhibirajući transkripciju proteina p53, čineći tako negativnu povratnu spregu unutar izoformi p53 (Aoubala i sur., 2011).

### 1.4.2. Interakcije proteina p53α i izoformi p73

Gen *TP73* sastoji se od 14 eksona i jednog alternativnog eksona (3'). Zbog mogućnosti alternativnog prekrajanja na 5' kraju i na 3' kraju, kao i unutarnjeg promotora, gen *TP73* teoretski prepisuje najmanje 35 različitih mRNA. Na slici 10 prikazan je gen *TP73* i proteinske izoforme koje kodira.



**Slika 10: Gen *TP73* i njegove proteinske izoforme.** (A) Gen *TP73* ima složenu strukturu. Posjeduje alternativni ekson 3', ima mogućnost alternativnog prekrajanja na 3' i 5' kraju i posjeduje alternativna mjesta početka translacije. (B) Izoforme proteina p73 mogu se svrstati u dvije osnovne skupine: izoforme koje posjeduju cjelovito transaktivacijsko područje (TAp73) i one kojima nedostaje dio ili cijelo transaktivacijsko područje (Ex2p73, ΔNp73, Ex2/3p73).

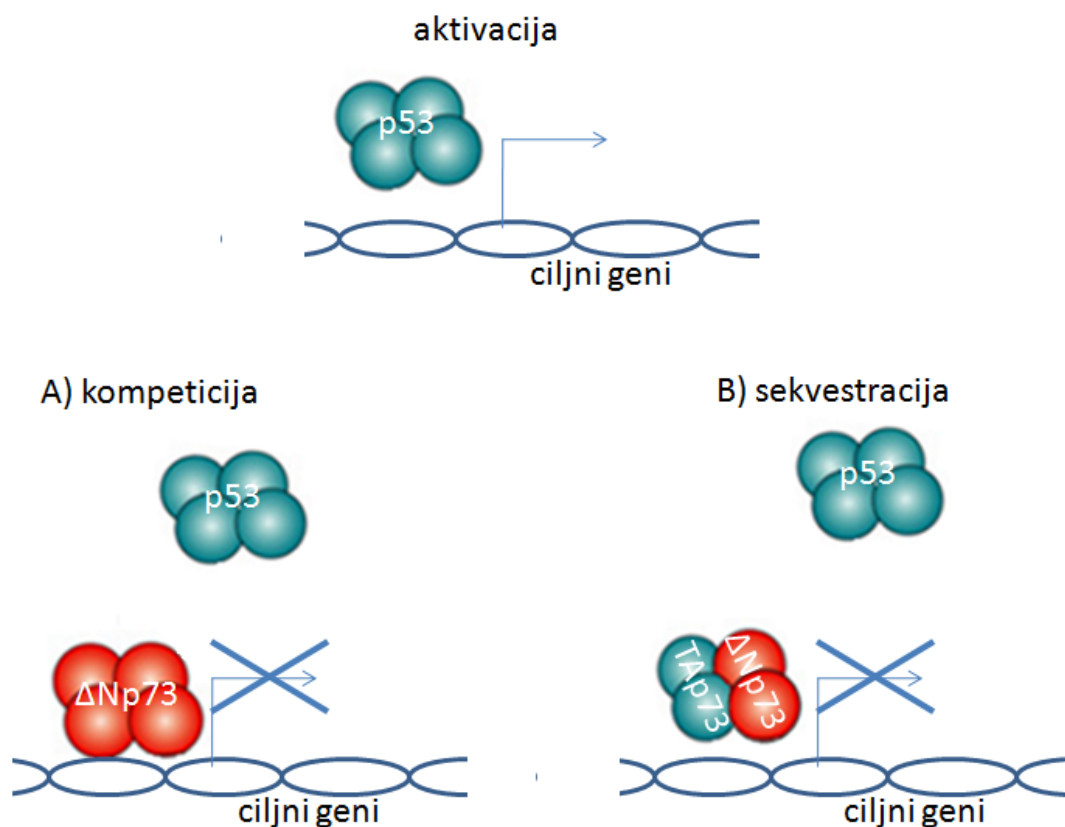
Kao što je navedeno u poglavlju 1.1.2., izoforme p73 imaju različite funkcije. Dok se izoforme TA ponašaju kao transkripcijski aktivatori, ostale izoforme ponašaju se kao inhibitori (Stiewe i sur., 2002b; Zaika i sur., 2002). Međutim, nisu sve izoforme TA jednako

aktivni transkripcijski faktori. Izoforma TAp73 $\beta$  ima puno jaču transkripcijsku aktivnost od TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\delta$  i TAp73 $\eta$ , dok izoforme TAp73 $\gamma$  i TAp73 $\epsilon$  uopće nemaju transkripcijsku aktivnost (De Laurenzi i sur., 1998; Stiewe i sur., 2002b). S druge strane, izoforme  $\Delta N$  mogu isto imati transkripcijsku aktivnost, međutim one ne aktiviraju iste ciljane gene kao izoforme TA (Stiewe i sur., 2002b; Zaika i sur., 2002). Nadalje, nisu sve izoforme  $\Delta N$  jednako jaki inhibitori. Tako je  $\Delta Np73\alpha$  jači inhibitor od  $\Delta Np73\beta$  (Stiewe i sur., 2002b).

Između proteina p53 $\alpha$  i izoformi p73 postoje dvije vrste interakcija: izravne fizičke interakcije i regulacijske interakcije. Zaika i suradnici (2002) pokazali su da između proteina p53 $\alpha$  i  $\Delta Np73\alpha$  dolazi do izravnih proteinskih interakcija kako u staničnim linijama tumora, tako i u tumorskim tkivima. Nadalje, pokazali su kako izoforma  $\Delta Np73\alpha$  u potpunosti inhibira transkripcijsku aktivnost proteina p53 sprečavajući time i apoptozu. Stiewe i suradnici (2002b) pokazali su da između proteina p53 $\alpha$  i  $\Delta Np73\beta$  dolazi do izravnih proteinskih interakcija, te da takva interakcija inhibira transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ .

Između proteina p53 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$ , te p53 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  ne postoje izravne proteinske interakcije ukoliko se radi o divljem tipu proteina p53 $\alpha$ . Međutim, mutirani protein p53 $\alpha$  stvara izravne proteinske interakcije s izoformom TAp73 $\alpha$  (Stiewe i sur., 2002b) i izoformom TAp73 $\beta$  (doktorska disertacija Arijane Zorić, neobjavljeni rezultati) preko DNA-vezne domene. Nadalje, Zorić i suradnici (2013) pokazali su kako izoforme TAp73 stvaraju izravne proteinske interakcije s izoformama p53.

Osim izravnih proteinskih interakcija, između ovih proteina postoje i regulacijske interakcije. Naime, izoforme p73 dijele visoku sličnost s proteinom p53 u DNA veznom području (oko 60%) te stoga imaju sposobnost prepoznavanja i vezanja na kanonske elemente koje prepoznaje protein p53 modulirajući tako njegov odgovor. Temeljem svih saznanja predložena su dva mehanizma kojima članovi p73 reguliraju transkripcijsku aktivnost p53. Prvi mehanizam je kompeticija. Tim mehanizmom  $\Delta Np73$  tetrameri konkuriraju tetramerima p53 ili TAp73 tako što se vežu na kanonske elemente i inhibiraju transkripciju nizvodnih gena (slika 11A). Drugi mehanizam je sekvencijacija. Taj mehanizam pretpostavlja nastanak heterotetramera između izoformi TA i  $\Delta N$  p73 koje konkuriraju homotetramerima p53 ili TAp73. Međutim, ti heterotetrameri, zbog nedostatka transaktivacijskog područja, nisu u mogućnosti aktivirati nizvodne gene (slika 11B) (Stiewe i sur., 2002b; Zaika i sur., 2002).



**Slika 11: Mehanizmi djelovanja izoformi  $\Delta Np73$  na transkripcijsku aktivnost proteina p53 i TAp73.** (A) Homotetramer ( $\Delta Np73$ ) kompetira za vezno mjesto p53 inhibirajući aktivaciju nizvodnih gena. (B) Heterotetramer (TAp73/ $\Delta Np73$ ) sjeda na vezno mjesto p53, no s obzirom da mu nedostaje cjelovito transaktivacijsko područje nema sposobnost aktivirati nizvodne gene.

### 1.4.3. Interakcije proteina p53 i obitelji proteina NME

Proteini obitelji NME utječu na aktivnost proteina p53. Dosadašnja istraživanja ukazuju na postojanje izravnih fizičkih i regulacijskih interakcija između proteina NME1 i p53 (Rahman-Roblick i sur., 2007; Cervoni i sur., 2006; Egistelli i sur., 2009; Jung i sur., 2007). Izravna fizička interakcija dokazana je i između proteina NME2 i MDM2, negativnog regulatora p53 (Polański i sur., 2011). Međutim, izravne interakcije između proteina NME2 i p53 do sada nisu eksperimentalno potvrđene.

Izravne interakcije između proteina NME1 i p53 u nekoliko staničnih linija u endogenim i egzogenim uvjetima našli su u svojim istraživanjima Jung i suradnici (2007). Okarakterizirali su ih kao disulfidne veze između dva cisteina, cisteina<sup>176</sup> koji se nalazi u DNA-veznom području proteina p53 i cisteina<sup>145</sup> u proteinu NME1.

Ostale interakcije između proteina NME1 i p53 okarakterizirane su kao regulacijske interakcije, a rezultati dosadašnjih istraživanja su kontradiktorni. Vlatković i suradnici (2015) u svom preglednom članku navode kako njihovi neobjavljeni rezultati pokazuju da NME1 potiskuje transkripcijsku aktivnost proteina p53, dok su Jung i suradnici (2007) pokazali da NME1 pojačava transkripcijsku aktivnost proteina p53.

Chen i suradnici (2003), te Rahman-Roblick i suradnici (2007) pokazali su regulacijsku povezanost proteina NME1 i p53. Obje grupe su pronašle da protein p53 utječe na transkripciju proteina NME1. Naime, gen *NME1* posjeduje TATA-box, mjesto vezanja proteina p53. Utjecaj proteina NME2 na transkripcijsku aktivnost proteina p53 do sada nije zabilježen.

#### **1.4.4. Interakcije proteina p53 i obitelji proteina GLI**

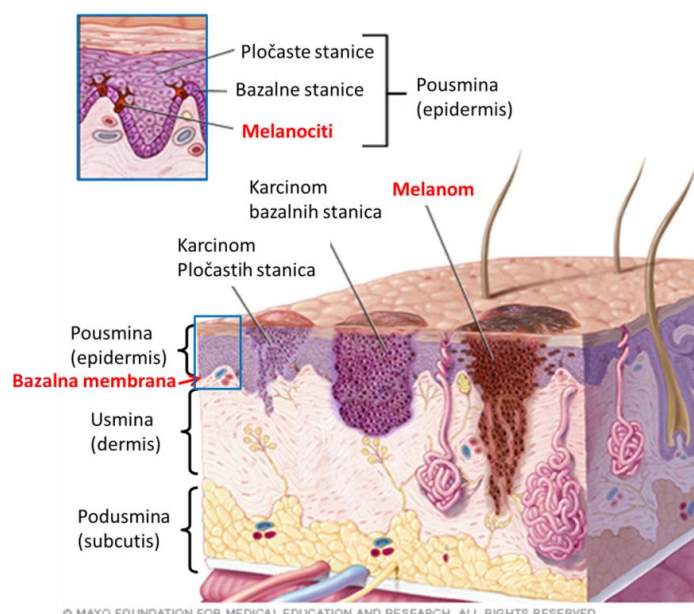
Između proteina p53 i proteina obitelji GLI postoje regulacijske interakcije, dok izravne proteinske interakcije do sada nisu pokazane. Stecca i Ruiz i Altaba (2009) pokazali su na matičnim stanicama neurona kako protein p53 inhibira transkripcijsku aktivnost GLI1 i GLI2, dok ne utječe na GLI3. Zauzvrat, protein GLI1 inhibira transkripcijsku aktivnost proteina p53. Mazzà i suradnici (2013) potvrdili su povezanost regulacije transkripcije između p53 i GLI1 u meduloblastomu. Oni su pokazali kako protein p53 smanjuje količinu GLI1 u stanicama i inhibira njegovu funkciju transkripcijskog faktora. Nadalje, Pandolfi i suradnici (2015) na stanicama melanoma isto su potvrdili komunikaciju između p53 i GLI1 te GLI2, te objašnjavaju mehanizam kojim pojačana ekspresija proteina GLI1 i GLI2 dovodi do inhibiranja transkripcijske aktivnosti proteina p53.

## 1.5. Metastatski melanom

### 1.5.1. Metastatski melanom kao jedan od najagresivnijih tumora

Koža je najveći organ ljudskog tijela s površinom od 1,7 m<sup>2</sup>. Sastoji se od tri sloja, površinskog sloja (pousmine ili epidermisa), srednjog sloja (usmine ili dermisa) i dubokog sloja (podusmine ili subcutisa). Između pousmine i usmine nalazi se bazalna membrana te bazalne stanice i melanociti.

U koži se javljaju tri vrste tumora: karcinom bazalnih stanica (nastaje iz bazalnih stanica smještenih na bazalnoj membrani), karcinom pločastih stanica (nastaje iz pločastih stanica koje grade pousminu) i melanom (nastaje iz melanocita).



**Slika 12: Građa kože i vrste karcinoma koje nastaju iz kože.** Koža je građena od tri sloja pousmine, usmine i podusmine. Između pousmine i usmine nalazi se bazalna membrana te melanociti i bazalne stanice. Iz melanocita nastaje melanom. Peuzeto i prilagođeno sa stranice Mayo Clinic (<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/melanoma/symptoms-causes/syc-20374884>).

Prema podacima Hrvatskog registra za rak iz 2014. godine, melanom se po učestalosti pojavljivanja nalazi na 11. mjestu te na njega otpada svega 3% svih malignih tumora. Iako njegova pojavnost nije visoka, kada metastazira predstavlja jedan od najagresivnijih i na liječenje najotpornijih oblika raka kože. Uspješnost izlječenja je visoka kod tumora u

početnom stanju (melanom *in situ*), dok je kod tumora u uznapredovalom stanju (metastatski melanom) vrlo loša (Lee i sur., 2000; Perlis i Herlyn, 2004).

Dijagnostika i liječenje metastatskog melanoma nije mnogo napredovalo u zadnjih desetak godina. Melanom se i dalje dijagnosticira na temelju kliničkog pregleda i biopsije, dok se metastatski melanom dodatno potvrđuje prisutnošću markera (proteina S100, HMB-45 ili Melan-A) imunohistokemijskom analizom. Upravo zbog toga, mnoge svjetske znanstveno-istraživačke grupe neumorno rade na pronalaženju biomarkera koji neće samo omogućiti brzu detekciju i dijagnozu metastatskog melanoma, nego će ujedno i odgovoriti na pitanje o biološkom ponašanju tumora i njegovih metastaza, te mehanizmu otpornosti na terapiju. Belter i suradnici u preglednom članku iz 2017. godine saželi su znanstvena istraživanja o potencijalnim biomarkerima metastatskog melanoma. U članku se navodi kako većinu potencijalnih biomarkera čine enzimi, sekretorni proteini i razni metaboliti. U tablici 1, preuzetoj od Beltera i suradnika (2017) navedeni su potencijalni biomarkeri.

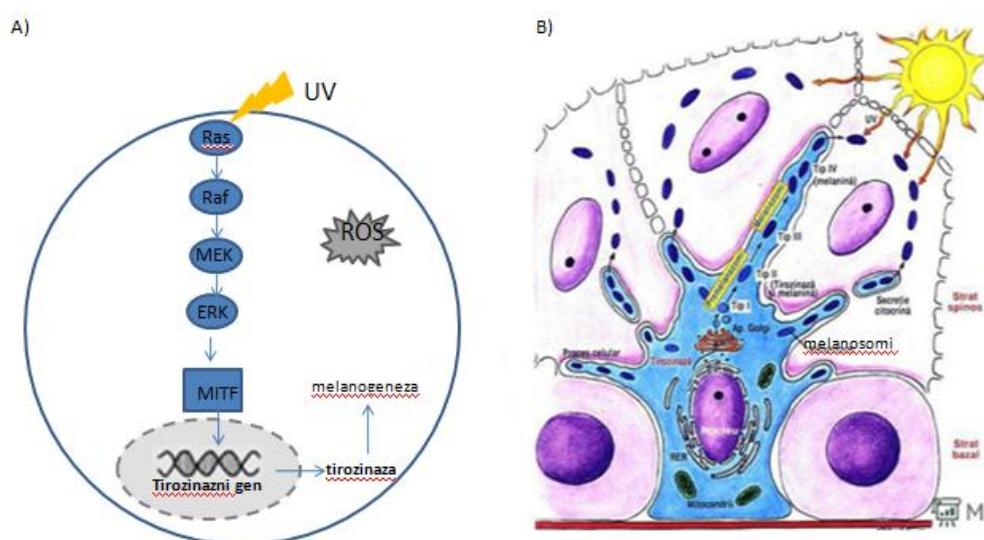
**Tablica 1: Potencijalni biomarkeri metastatskog melanoma.** Preuzeto i prilagođeno od Belter i suradnici (2017).

	Potencijalni biomarkeri
<b>enzimi</b>	LDH, tirozinaza, Cox-2, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-23, MT1-MMP, TIMP-1, IDO, katepsin-K, CD10, legumain
<b>sekretorni proteini</b>	VEGF, VEGF-C, VEGFR-3, osteopontin, galektin-3, YKL-40, MIA, reaktivni protein C, sICAM, cVCAM, CEACAM, CYT-MMA, MAGE, MART-1, TA90
<b>proteini S100</b>	S100B, S100A2, S100A4, S100A6, S100A8/A9, S100A13, S100P
<b>markeri matičnosti</b>	obitelj proteina SOX
<b>metaboliti</b>	5-S-cisteinil-DOPA, L-DOPA, L-tirozin, 6H5MI2C
<b>nukleinske kiseline</b>	miRNA-221, miRNA-29c

Unatoč dosadašnjim istraživanjima, korisni markeri za kliniku i dalje nisu prepoznati. Stoga je pronalazak molekula koje bi služile kao markeri za rano dijagnosticiranje melanoma od velikog značaja.

### 1.5.2. Metastatski melanom nastaje uslijed izlaganja UV-zračenju

Nastanak svih tumora kože povezuje se s izlaganjem kože štetnom ultraljubičastom zračenju (UV, prema engl. *ultraviolet*). Naime, UV-zračenje izaziva oštećenja u molekuli DNA koja, ako se pravilno ne poprave, stvaraju mnogobrojne mutacije koje mogu izazivati promjene u genima odgovornima za kontrolu rasta i očuvanje integriteta stanice (Perlis i Herlyn, 2004). Melanom nastaje iz melanocita, stanica smještenih na bazalnoj membrani. Melanociti su, zbog svog smještaja u okolini koja je izložena štetnom UV-zračenju, razvili poseban mehanizam obrane. Oni proizvode pigment melanin, sastojak koji je ključan u zaštiti stanica kože od štetnog UV-zračenja. Melanin se sintetizira reakcijom oksidacije aminokiseline tirozin. UV-zračenje aktivira signalni put RAS-RAF-MEK-ERK koji aktivira MITF, transkripcijski faktor koji aktivira gen za tirozinazu. Potom tirozinaza, u složenom biokemijskom procesu, oksidira tirozin do melanina (slika 11A) (Jhappan i sur., 2003). Nastali melanin pakira se u vezikule zvane melanosomi koji se prenose u okolne stanice kože, gdje se akumuliraju oko stanične jezgre, štiteći tako DNA od mutacija izazvanih zračenjem (Slika 11B) (Hearing, 1999).



**Slika 13: Sinteza melanina.** (A) Pod utjecajem UV-zračenja dolazi do aktivacije signalnog puta RAS-RAF-MEK-ERK koji aktivira gen za sintezu melanina, pigmenta koji štiti stanice od štetnog UV zračenja. (B) Nastali melanin pakira se u vezikule zvane melanosomi koji se prenose u okolne stanice kože, gdje se akumuliraju oko stanične jezgre, štiteći tako DNA od mutacija izazvanih zračenjem.

Signalni put RAS-RAF-MEK-ERK, osim što je uključen u sintezu melanina, odgovoran je za proliferaciju stanica. Svi članovi ovog signalnog puta su onkogeni, koji kada



mutiraju, izazivaju neprekidnu aktivaciju signalnog puta koja dovodi do pojačane proliferacije stanica i nastanka tumora. Upravo je BRAF mutiran (najčešća mutacija je BRAF<sup>V600E</sup>) u 50-70% slučajeva melanoma (Perlis i Herlyn, 2004). Danas su razvijeni brojni lijekovi koji ciljaju navedeni signalni put, međutim zbog visoke stope mutacija, stanice tumora vrlo brzo razvijaju otpornost na lijekove. Stoga je potrebno naći nove molekule i nove signalne puteve koji bi mogli imati važnu ulogu u sprečavanju razvoja metastatskog melanoma.

### 1.5.3. Protein p53 je neaktivan u metastatskom melanomu

Protein p53 je jedan od najčešće mutiranih proteina u ljudskim tumorima, sa stopom mutacija većom od 50%. Mutirani protein p53 ne obavlja ulogu tumorskog supresora, nego naprotiv, može steći onkogeni potencijal.

Tumori kože nastaju kao posljedica oštećenja stanica uslijed UV-zračenja, međutim stopa mutacija proteina p53 u njima vrlo varira. Dok su u tumorima bazalnih i pločastih stanica mutacije gena *TP53* česte (oko 60% slučajeva), u metastatskom melanomu su vrlo rijetke (manje od 10%). Unatoč niskoj stopi mutacija, protein p53 svejedno ne uspijeva spriječiti nastanak i rast melanoma (Terzian i sur., 2010). Stoga se postavlja pitanje što to u metastatskom melanomu sprečava divlji tip proteina p53 da obavlja svoje funkcije. Do sada je predloženo nekoliko mehanizama koji govore o inaktivaciji proteina p53 u melanomu. Jedan mehanizam govori o prekomjernoj ekspresiji proteina MDM2, negativnog regulatora proteina p53. U metastatskom melanomu, zbog mutacija, signalni put RAS-RAF-MEK-ERK je konstantno aktivan i dolazi do pojačane transkripcije proteina MDM2 koji sprečava nakupljanje i stabilizaciju proteina p53 (Terzian i sur., 2010).

Nadalje, pojačana ekspresija izoformi proteina p53,  $\Delta 40p53\alpha$  i  $p53\beta$  u metastatskom melanomu pogoduje stvaranju kompleksa  $\Delta 40p53\alpha/p53\alpha$  (Avery-Kiejda i sur., 2008; Takahashi i sur., 2014) i  $p53\beta/p53\alpha$  (Avery-Kiejda i sur., 2008) koji moduliraju transkripcijsku aktivnost proteina p53. Također, pojačana ekspresija izoformi proteina p63 dovodi do nastanka kompleksa između  $\Delta Np63$  i  $p53\alpha$  koji inhibiraju transkripcijsku aktivnost proteina p53 (Matin i sur., 2013). Uslijed aktivnog signalnog puta RAS-RAF-MEK-ERK pojačana je i ekspresija proteina GLI1 u metastatskom melanomu (Stecca i Ruiz i Altaba, 2009). Proteini GLI1 i GLI2 aktiviraju transkripciju proteina iASPP koji stvara kompleks s proteinom p53, inhibirajući njegovu transkripcijsku aktivnost (Pandolfi i sur., 2015).

## 2. CILJEVI RADA

U više od 50% tumora protein p53 je mutiran te ne obavlja svoju ulogu tumorskog supresora. S druge strane, u metastatskom melanomu stopa mutacija proteina p53 manja je od 10%, no svedjedno, protein p53 ne uspijeva obavljati svoju ulogu.

Cilj ovog istraživanja bio je detaljnije istražiti mehanizme koji sprečavaju protein p53 da u metastatskom melanomu obavlja svoju tumor-supresorsku ulogu. Mi pretpostavljamo da izravne proteinske i regulacijske interakcije, osobito s drugim članovima obitelji p53, te članovima obitelji NME i GLI doprinose mehanizmu inaktivacije proteina p53.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- ♣ Istražiti ekspresiju gena obitelji p53 (izoforme p53 i p73), obitelji NME (*NME1* i *NME2*), te obitelji GLI (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) u metastatskom melanomu čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu, te u staničnim linijama melanoma metodom RT-qPCR
- ♣ Istražiti ekspresiju proteina obitelji p53 (izoforme p53 i p73), obitelji NME (*NME1* i *NME2*), te obitelji GLI (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) u metastatskom melanomu čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu, te u staničnim linijama melanoma čovjeka metodom Western blot
- ♣ Istražiti postojanje izravnih proteinskih interakcija između proteina p53 i ostalih članova obitelji p53 (izoforme p53 i p73), obitelji NME (*NME1* i *NME2*), te obitelji GLI (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) u staničnim linijama metastatskog melanoma metodom ko-immunoprecipitacije
- ♣ Istražiti utjecaj članova obitelji p53 (izoforme p53 i p73), obitelji NME (*NME1* i *NME2*), te obitelji GLI (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) na transkripcijsku aktivnost proteina p53 u staničnoj liniji metastatskog melanoma mjerenjem luciferazne aktivnosti
- ♣ Istražiti utjecaj članova obitelji p53 (izoforme p53 i p73), obitelji NME (*NME1* i *NME2*), te obitelji GLI (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) na apoptotsku aktivnost proteina p53 u staničnoj liniji metastatskog melanoma mjerenjem apoptotske aktivnosti na protočnom citometru

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Biološki materijal

#### 3.1.1. Kompetentne bakterije

Koristili smo bakterije *Echerichia coli*, kemokompetentni soj DH5 $\alpha$  (Termo Fisher Scientific, USA).

#### 3.1.2. Stanične linije

U istraživanjima smo koristili panel od 8 staničnih linija melanoma čovjeka, koje smo dobili ljubaznošću dr. sc. Daniele Bergamashia, Blizzard Institute, Velika Britanija, te staničnu liniju epidermalnih melanocita čovjeka HEMa (od engl. *Human Epidermal Melanocytes, adult*; Life Technologies Corporation, SAD) kao kontrolnu staničnu liniju. Stanične linije su opisane u tablici 2.

**Tablica 2: Popis staničnih linija**

Stanična linija	ATCC	Status	Status gena <i>TP53</i>	Status gena <i>BRAF</i>
LM6(4405P)	CVCL_7680	Primarni melanom	Djelomično deletiran	Divlji tip
WM793B	CRL_2806 <sup>TM</sup>		Divlji tip	c.1799T>A (p.V600E)
Mel224	CVCL_U915		c.524G>C (p.R175P)	Divlji tip
Mel505	CVCL_U916		c.818G>A;c.925C>T (p.R273H; p.P309S)	Divlji tip
A375M	CRL_1619 <sup>TM</sup>	Metastatski melanom	Divlji tip	c.1799T>A (p.V600E)
Mel501	CVCL_4633		Divlji tip	Divlji tip
CHL-1	CRL_9446 <sup>TM</sup>		c.578A>G (p.H193R)	Divlji tip
WM983B	CVCL_6809		c.833C>T (p.P278L)	c.1799T>A (p.V600E)
HEMa	PCS-200-013 <sup>TM</sup>	Melanociti	Divlji tip	Divlji tip

Staničnu liniju H1299 (metastaza malih stanica karcinoma pluća; ATCC: CRL-5803<sup>TM</sup>) sa djelomično deletiranim genom *TP53* koristili smo za ekspresiju proteina od interesa.

### 3.1.3. Ispitanici

U suradnji s KBC Sestre milosrdnice, Zagreb, prikupili smo tkiva metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva 36 pacijenata (26 muškaraca i 10 žena). Dob pacijenata je bila u rasponu od 39 do 87 godina, s medijanom od 67 godina. Etičko povjerenstvo KBC Sestre milosrdnice kao i Bioetičko povjerenstvo Instituta Ruđer Bošković odobrilo je istraživanje. Svi pacijenti dali su pismeni pristanak da se njihova tkiva koriste u istraživačke svrhe.

## 3.2. Rad s bakterijskim kulturama

Tablica 3: Materijali korišteni u radu s bakterijskim kulturama

Materijal	Puno ime	Proizvođač
LB prah	Prah Luria-Bertani (engl. <i>LB Broth</i> )	Sigma-Aldrich, SAD
Agar		
Orange G		
Trizma base		
Ampicilin		Pliva, Hrvatska
Agaroz		Merck, SAD
deH <sub>2</sub> O	Destilirana voda	
Octena kiselina		Kemika, Hrvatska
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina	
Midori Green		Nippon Genetics Europe, Njemačka

### 3.2.1. Transformacija bakterija plazmidnim vektorima

Suspenciju kemokompetentnih bakterija *Escherichia coli* soj DH5 $\alpha$  (50  $\mu$ L) pomiješali smo s 10 ng plazmidnog vektora i ostavili 5 min na ledu. Smjesu smo zatim inkubirali tijekom 45 s pri 42°C, izazivajući tako toplinski šok koji pospješuje unos strane DNA u bakterije. Potom smo u bakterijsku smjesu inkubirali 5 min na ledu, a zatim joj dodali 200  $\mu$ L tekuće hranjive podloge LB (20g LB prah, 1L deH<sub>2</sub>O) i inkubirali tijekom 60 min pri 37°C uz trešnju (300 okretaja u min). Nakon inkubacije, dio bakterijske suspenzije nasadili smo na krutu hranjivu podlogu za rast bakterija LB-agar (20g LB prah, 13g agar, 1L deH<sub>2</sub>O) uz dodatak antibiotika ampicilina (100  $\mu$ g/mL), te inkubirali tijekom noći pri 37°C u inkubatoru za rast bakterija. Idućeg jutra pojedinačne kolonije bakterija nasadili smo u tekuću hranjivu podlogu LB uz dodatak antibiotika i inkubirali tijekom noći pri 37°C uz trešnju (300 okretaja u min).

### 3.2.2. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA iz bakterijskih stanica koristili smo komplet NucleoBond Xtra – plasmid Midiprep (Macherey-Nagel, Njemačka). Postupak izolacije proveli smo prema uputama proizvođača. Nakon izolacije koncentraciju plazmidne DNA odredili smo na uređaju Nanodrop NP60 (Implen GmbH, Njemačka), a kvalitetu na 1% gelu agaroze. Agarozu smo otopili u puferu  $1 \times$  TAE (od engl. *Tris-acetate-EDTA*: 40 mM Tris, 20 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8,6), uz dodatak boje Midori Green koja se interkalira u DNA i omogućuje vizualizaciju uzorka. Uzorke smo prije nanošenja na gel pomiješali s 1  $\mu$ L pufera za nanošenje  $6 \times$  Orange G (50% glicerol, 20 mM EDTA, 0,25% Orange G boja). Elektroforeza se odvijala pri naponu od 50 V tijekom 30 min. Za detekciju smo koristili uređaj za vizualizaciju Alliance 4.7 (UVItec, Velika Britanija). Uz uzorke, na gel smo nanijeli i standard za određivanje molekulske mase dvolančane DNA, 1 Kb Plus DNA Ladder, raspona 0,1-12 kb (Thermo Fisher Scientific, SAD).

### 3.3. Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvija u sterilnim uvjetima u kabinetu za sterilni rad s laminarnim protokom zraka. U tablici 4 navedeni su materijali koje smo koristili u radu sa staničnim kulturama, dok su u tablici 5 navedeni sastavi pojedinih pufera.

**Tablica 4: Materijali korišteni u radu sa staničnim kulturama**

Materijal	Puno ime	Proizvođač
DMEM	Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD
Natrijev piruvat		
Tripsin		
254	Hranjiva podloga 254, engl. <i>Medium 254</i>	Lonza, Švicarska
RPMI 1640	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>	
FBS	Serum fetusa goveda engl. <i>Fetal bovine serum</i>	Sigma-Aldrich, Njemačka
L-glutamin		
Streptomycin		
Penicilin		Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, SAD
NEAA	Neesencijalne amino kiseline engl. <i>Non essential amino acids</i>	
HMGs-2	engl. <i>Human melanocytes growth supplement-2</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD
DMSO	Dimetil-sulfoksid	
MTT	3-(4,5 dimetiliazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev bromid	Kemika, Hrvatska
		Chemicon, SAD

**Tablica 5: Sastav pufera korištenih u radu sa staničnom kulturom**

Ime	Sastav
Tekuća hranjiva podloga za zamrzavanje	45% FBS, 45% kompletirana tekuća hranjiva podloga* 10% DMSO
*Kompletirana tekuća hranjiva podloga	Sastav svake tekuće hranjive podloge naveden je u tablici 6
PBS	137 mM NaCl (Kemika, Hrvatska), 2,7 mM KCl (Kemika, Hrvatska), 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kemika, Hrvatska), 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O, pH=7,4 (Kemika, Hrvatska)

### 3.3.1. Uzgoj staničnih kultura

Sve stanične linije koje smo koristili u našim istraživanjima su adherentne i uzgajali smo ih u tekućim hranjivim podlogama kako je navedeno u tablici 6. Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama u inkubatoru za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija) u vlažnoj atmosferi pri 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>.

**Tablica 6: Sastav kompletiranih tekućih hranjivih podloga za rast pojedinih staničnih linija**

Sastav kompletiranih tekućih hranjivih podloga	Stanične linije
RPMI, 10% FBS, 1mM L-glutamin, 1mM natrijev piruvat, 100 µg/mL streptomycin, 100 ug/mL penicilin	WM793B A375M WM983B LM6 (4405P)
RPMI, 10% FBS, 1mM L-glutamin, 1mM natrijev piruvat, 100 µg/mL streptomycin, 100 ug/mL penicilin, 0,5mM NEAA	Mel224 Mel505
DMEM, 10% FBS, 1mM L-glutamin, 1mM natrijev piruvat, 100 µg/mL streptomycin, 100 ug/mL penicilin	CHL1 H1299
DMEM, 10% FBS, 1mM L-glutamin, 1mM natrijev piruvat, 100 µg/mL streptomycin, 100 ug/mL penicilin, 0,5mM NEAA	Mel501
254 10% HMGS-2	primarni melanociti (HEMa)

### 3.3.2. Prolazna transfekcija stanica u kulturi

Transfekcija je proces unosa strane DNA ili RNA u stanicu. Postoje dvije vrste transfekcije, prolazna i stabilna. Dok prolaznom transfekcijom učinak unesenog gena možemo proučavati tijekom 1-4 dana, stabilnom transfekcijom strana se DNA ugrađuje u genom stanice i time je trajno mijenjamo.

#### 3.3.2.1. Prolazna transfekcija stanica u kulturi plazmidnom DNA

Stanične linije melanoma prolazno smo transficirali koristeći metodu lipofekcije, odnosno unosa plazmidne DNA pomoću liposoma. Za potrebe pokusa koristili smo nekoliko kompleta za lipofekciju. Za transfekciju stanične linije H1299 koristili smo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD), za transfekciju stanične linije A375M koristili smo Turbofect (Thermo Fisher Scientific, SAD), a za transfekciju stanične linije WM793B koristili smo X-fect (Takara Bio, SAD).

Stanice smo nasadili dan ranije tako da na dan transfekcije budu 70-90% popunjene, ovisno o uputama proizvođača za pojedini komplet. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanice smo isprali PBS-om i izolirali proteine za daljnje eksperimente. Popis ekspresijskih vektora korištenih u ovoj disertaciji prikazan je u tablici 7.

Prolaznu transfekciju stanica koristili smo u nekoliko eksperimenata. Staničnu liniju H1299 prolazno smo transficirali ekspresijskim plazmidima koji nose određenu izoformu proteina p53 ili p73 kako bi iz lizata stanica pripremili „standarde“ koji će nam pomoći prilikom određivanja položaja pojedinih izoformina gelu. Stanične linije A375M i WM793B prolazno smo transficirali ekspresijskim plazmidima koji nose proteine od interesa za potrebe testa ko-imunoprecipitacije (coIP), testa luciferazne aktivnosti i testa apoptoze.

Tablica 7: Popis ekspresijskih vektora korištenih u doktorskoj disertaciji

Naziv	Vektor	Biljeg	Upotreba:
pcDNA3	pcDNA3	Prazni vektor	coIP, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
pEGFP	pEGFP	GFP	coIP, testiranje uspješnosti transfekcije
pG13		Gen za luciferazu iz krijesnice	Test aktivnosti luciferaze
renilla		Gen za luciferazu iz renille	Test aktivnosti luciferaze
p53 $\alpha$ _flag	pcDNA3	FLAG	coIP
p53 $\alpha$	pCMV-NeoBam		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
p53 $\beta$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
p53 $\gamma$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
$\Delta$ 40p53 $\alpha$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
$\Delta$ 40p53 $\beta$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
$\Delta$ 40p53 $\gamma$	pcDNA3		Standard
$\Delta$ 133p53 $\alpha$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
$\Delta$ 133p53 $\beta$	pcDNA3		Standard
$\Delta$ 133p53 $\gamma$	pcDNA3		Standard
$\Delta$ 160p53 $\alpha$	pcDNA3		Standard
$\Delta$ 160p53 $\beta$	pcDNA3		Standard
$\Delta$ 160p53 $\gamma$	pcDNA3		Standard
TAp73 $\alpha$	pcDNA3		Standard
TAp73 $\beta$	pcDNA3		Standard
$\Delta$ Np73 $\alpha$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
$\Delta$ Np73 $\beta$	pcDNA3		Standard, test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
NME1	pcDNA3		Test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
NME2	pcDNA3		Test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
GLI1	pcDNA3		Test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
GLI2	pcDNA3		Test aktivnosti luciferaze, test apoptoze
GLI3	pcDNA3		Test aktivnosti luciferaze, test apoptoze

### 3.3.2.2. Prolazna transfekcija stanica u kulturi malim interferirajućim molekulama RNA

Prolaznu transfekciju stanica malim interferirajućim molekulama RNA (siRNA, od engl. *small interfering RNA*) koristili smo kako bi utišali ekspresiju pojedine skupine izoformi gena *TP53*. Koristili smo metodu reverzne transfekcije koristeći Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD) slijedeći upute proizvođača. Popis siRNA



korištenih u disertaciji naveden je u tablici 8. Četrdeset i osam sati nakon transfekcije stanice smo isprali PBS-om i izolirali proteine za daljnje analize.

**Tablica 8: Popis malih interferirajućih molekula RNA (siRNA)**

Naziv	Pozicija u nukleotidnom slijedu (nt)	Lokacija	Nukleotidni slijed 5'-3'	Ciljane izoforme
panp53	18363-18370/ 18714-18724	Eksoni 7 i 8	GACTCCAGTGGTAATCTAC	sve
si $\alpha$	21846-21864	Ekson10	GUGAGCGCUUCGAGAUGUU	p53 $\alpha$ , $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , $\Delta$ 160p53 $\alpha$
si $\beta$	19211-19229	Ekson 9 $\beta$	GGACCAGACCAGCUUUCAA	p53 $\beta$ , $\Delta$ 40p53 $\beta$ , $\Delta$ 133p53 $\beta$ , $\Delta$ 160p53 $\beta$
si $\gamma$	19009-19016/ 19285-19295	Eksoni 9 i 9 $\gamma$	CCCUUCAGAUGCACUUGA	p53 $\gamma$ , $\Delta$ 40p53 $\gamma$ , $\Delta$ 133p53 $\gamma$ , $\Delta$ 160p53 $\gamma$

### 3.3.3. Izazivanje oštećenja DNA

#### 3.3.3.1. Oštećenje DNA izazvano radijacijskim zračenjem

Oštećenje DNA izazvali smo  $\gamma$ -zračenjem (izvor  $^{60}\text{Co}$ , IRB). Koristili smo dvije doze zračenja, 5 i 10 Gy. Brzina doze u oba slučaja je iznosila 2 Gy/min. Nakon zračenja, stanicama smo promijenili hranjivu podlogu, te ih prikupili 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 i 48 sati nakon zračenja.

#### 3.3.3.2. Oštećenje DNA izazvano kemijskim agensima

Oštećenje DNA izazvali smo protutumorskim lijekovima etopozidom i cisplatinom. Stanice smo prikupili 24, 48 i 72 sata nakon dodavanja etopozida (Sandoz, Njemačka) ili cisplatine (Sigma-Aldrich, Njemačka) u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$ . To je koncentracija koja je u obje stanične linije izazivala smrt u 50% stanica ( $\text{IC}_{50}$ ), a odredili smo je testom MTT.

#### 3.3.4. Određivanje preživljenja stanica testom MTT

Test MTT je kolorimetrijska metoda kojom se određuje postotak preživljenja stanica. MTT je u vodi topljiva žuta tetrazolijeva sol (3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolijev

bromid) koju enzim dehidrogenaza iz mitohondrija živih stanica reducira u ljubičasti netopljivi formazan. Kristali formazana se otapaju u dimetilsulfoksidu (DMSO, Kemika, Hrvatska) te se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija pri 570 nm. Izmjerena apsorbancija razmjerna je broju živih stanica.

### 3.3.4.1. Određivanje optimalnog broja stanica za nasađivanje

Prije izvođenja samog testa odredili smo optimalan broj stanica za nasađivanje. Taj broj varira s obzirom na vrstu stanica i duljinu trajanja pokusa, te smo ga odrediti za svaku staničnu liniju ovisno o duljini trajanja pokusa. Broj stanica koji se koristi za test MTT mora na dan očitavanja vrijednosti ležati u linearnom dijelu grafa s apsorbancijom u rasponu od 0,75 do 1,25.

Kako bi odredili optimalni broj stanica potreban za naše pokuse, stanice smo prema shemi na slici 14, nasadili na mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića i ostavili iduća 4 dana (nulti dan + 3 dana tretmana) u inkubatoru. Sve pokuse izveli smo u 4 paralelna uzorka (četriplicatu).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A375M</b>	A											
	B	1000 stanica	1500 stanica	2000 stanica	3000 stanica	3500 stanica	4000 stanica	5000 stanica	7000 stanica	8000 stanica	9000 stanica	10000 stanica
	C											
	D											Prazni bunarići
<b>WM793B</b>	E											
	F	1000 stanica	1500 stanica	2000 stanica	3000 stanica	3500 stanica	4000 stanica	5000 stanica	7000 stanica	8000 stanica	9000 stanica	10000 stanica
	G											
	H											Prazni bunarići

Slika 14: Shematski prikaz rasporeda stanica u pločici s 96 bunarića za test MTT, s označenim brojem nasadenih stanica. Svaki tretman analiziran je u četriplicatu.

Nakon 96 sati stanicama smo uklonili tekuću hranjivu podlogu i dodali 20µL matične otopine MTT-a u koncentraciji 0,5 µg/µL, te nakon inkubacije od 3 sata pri 37°C otopili smo

nastale kristale formazana u 170  $\mu\text{L}$  DMSO-a. Osim na stanice, matičnu otopinu MTT-a dodali smo i u 8 dodatnih bunarića kako bismo izmjerili apsorbanciju slijepe probe. Pločicu smo mehanički protresli na tresilici kako bi se kristali u potpunosti otopili te mjerili apsorbanciju pri 570 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (Labsystems Multiskan MS, Finska).

### 3.3.4.2. Određivanje preživljenja stanica

Kako bi odredili letalnu dozu u kojoj 50% stanica umire ( $IC_{50}$ , *od engl. inhibitory concentration*), stanice smo tijekom 72 sata izložili etopozidu, odnosno cisplatinu. U prethodnom pokusu odredili smo optimalan broj stanica za nasadivanje (2000 stanica po bunariću za A375M staničnu liniju i 2500 stanica po bunariću za WM793B staničnu liniju).

Stanice smo nasadili u pločicu s 96 bunarića u volumenu od 200  $\mu\text{L}$ . Nakon 24 sata (tzv. nulti dan) stanicama smo promijenili tekuću hranjivu podlogu, dodajući im različite koncentracije spojeva koje smo istraživali u volumenu od 200  $\mu\text{L}$ . Za svaku koncentraciju rađeni su četiriplikati, prema shemi na slici 15. Ostatak pokusa jednak je pokusu opisanom u prethodnom poglavlju (3.3.4.1).

		A375M						WM793B							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<b>etopozid</b>	A	Prazni bunarići	Netretirane stanice												
	B				0.5 $\mu\text{M}$	1.0 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{M}$	5.0 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.0 $\mu\text{M}$	2.5 $\mu\text{M}$	5.0 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	
	C														
	D														
<b>cisplatin</b>	E							Netretirane stanice							
	F	0.1 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.0 $\mu\text{M}$	2.0 $\mu\text{M}$	5.0 $\mu\text{M}$		0.1 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	1.0 $\mu\text{M}$	2.0 $\mu\text{M}$	5.0 $\mu\text{M}$		
	G														
	H														

Slika 15: Shematski prikaz rasporeda stanica u pločici s 96 bunarića za test MTT, s označenim koncentracijama spojeva. Svaki tretman analiziran je u četiriplikatu.

Preživljenje stanica je proporcionalno izmjerenoj apsorbanciji i računali smo je prema izrazu:

$$(\%) \text{ preživljenja} = \frac{\text{Apsorbancija stanica tretiranih spojem}}{\text{Apsorbancija kontrolnih stanica}} \times 100$$

## 3.4. Analiza RNA

### 3.4.1. Izdvajanje ukupne RNA

Za izdvajanje ukupne RNA koristili smo dva različita načina, ovisno o tome jesmo li izdvajali RNA iz staničnih linija ili iz tkiva. RNA iz staničnih linija izdvajali smo koristeći komercijalni komplet, dok smo RNA iz tkiva izdvajali koristeći reagens TRIzol te potom komercijalni komplet za dodatno pročišćavanje. Svi koraci izdvajanja ukupne RNA odvijaju se na ledu i u centrifugi ohlađenoj pri 4°C kako bi se očuvao integritet RNA.

Za izdvajanje ukupne RNA iz melanocita i stanica melanoma čovjeka koristili smo komplet za izolaciju PureLink® RNA Mini Kit (Ambion Thermo Fisher Scientific, SAD) uz tretman DNazom (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izoliranu RNA pohranili smo pri -80°C.

Za izdvajanje ukupne RNA iz tkiva metastatskog melanoma čovjeka i pripadajuće zdrave kože koristili smo reagens TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD). Izdvojili smo oko 100 mg zamrznutog tkiva te dodali 1 mL TRIzola. Sterilnim škaricama usitnili smo tkivo i sadržaj inkubirali 5 min na ledu. Na tako homogenizirani sadržaj tkiva dodali smo 200 µL kloroforma (Kemika, Hrvatska) te smo sve dobro miješali rotacijskom miješalicom tijekom 15 s. Sadržaj smo potom inkubirali na ledu tijekom 10 min te centrifugirali pri 4°C tijekom 15 min pri 12000 × g. Centrifugiranjem su se razdvojile vodena faza, interfaza i organska faza. U gornjoj, vodenoj fazi nalazi se RNA. Tu fazu smo pažljivo mikropipetom prenijeli u čistu mikroeprevetu i dodali 500 µL izopropanola. Sadržaj mikroeprevete smo dobro promiješali i ostavili na ledu 10 min, te potom centrifugirali pri 4°C i 10 min pri 2000 × g. Uklonili smo supernatant, a talog RNA isprali s 1mL 75%-tnog etanola i centrifugirali pri 4°C tijekom 5 min pri 7500 × g. Ponovno smo odlili supernatant i talog

ostavili da se osuši kako bi zaostali etanol ishlapio. RNA smo otopili u 30  $\mu$ L kvarcne vode, te ju pročistili koristeći komplet za izolaciju PureLink® RNA Mini Kit uz tretman DNazom.

Ukupna RNA iz melanocita kontaminirana je melaninom, pa smo u svrhu uklanjanja melanina koristili nekoliko tehnika navedenih u tablici 9.

**Tablica 9: Načini izolacije RNA ili obrade uzorka RNA u svrhu uklanjanja melanina**

	Vrsta tretmana	Kratak opis postupka
Načini izolacije RNA	Izolacija RNA komercijalnim kitovima	Korišteni kompleti tvrtki Ambion i Roche po uputama proizvođača
	Izolacija RNA s Trizolom i RNAzolom	RNA izolirani po protokolu za Trizol i RNAzol i nakon toga pročišćeni na kolonicama
	Izolacija RNA kuhanjem s Trizolom	U literaturi su pronađeni podatci da se kuhanjem inaktivira melanin. Postupak isti kao prethodni, uz kuhanje uzorka 2 min na 65 °C u prvom koraku izolacije.
	Izolacija RNA uz korištenje pufera CTAB	U literaturi pronađen protokol za izolaciju DNA/RNA iz uzoraka korištenjem CTABa kako bi se uklonio zaostali melanin
Načini obrade uzorka RNA	Dodavanje BSA u reakciju reverzne transkripcije	U literaturi pronađeni podaci da se utjecaj melanina na polimeraznu aktivnost u reakciji reverzne transkripcije inhibira dodatkom BSA (albumina iz seruma goveda)
	Dodatak proteinaze K u izolirani uzorak RNA	U literaturi pronađeni podaci da melanin tvori kompleks s proteinazom K i tako ne ometa polimeraznu aktivnost
	Korištenje komercijalnih kompleta za uklanjanje inhibitora polimeraza	Uklanjanje inhibitora polimeraze (melanina) komercijalnim kolonicama po uputama proizvođača
	Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu s manjim količinama RNA	Po protokolu za reverznu transkripciju koristi se 2000 ng RNA po reakciji. Isprobali smo manje početne količine RNA (400, 500, 1000 i 1500 ng) kako bi i količina melanina u reakciji bila manja

Koncentraciju RNA mjerili smo spektrofotometrijski na uređaju Nanodrop NP60. Dobivenu RNA pohranili smo pri -80°C za daljnje analize. Kvalitetu izolirane RNA provjerili smo elektroforezom u gelu agaroze (objašnjeno u poglavlju 3.2.2).

### 3.4.2. Reverzna transkripcija

RNA smo prepisali u cDNA metodom reverzne transkripcije koristeći komplet High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific SAD) prema uputama proizvođača. Reakcija reverzne transkripcije ukupnog volumena 20  $\mu$ L sastoji se od 10  $\mu$ L 2  $\times$  reakcijske smjese (tablica 10), a drugih 10  $\mu$ L otpada na 2  $\mu$ g RNA nadopunjene kvarcnom vodom do konačnog volumena od 10  $\mu$ L.

Tablica 10: Sastav 2 × reakcijske smjese za reakciju reverzne transkripcije

Komponenta	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji (μL)
Kvarcna voda			3,2
10 × RT pufer	10 ×	1 ×	2
10 × nasumični primeri	10 ×	1 ×	2
Reverzna transkriptaza	(50 U/μL)	2,5 U/μL	1
Inhibitor RNaze	(20 U/μL)	1 U/μL	1
25 × dNTP	(100 mM)	1 × (10 mM)	0,8
<b>Ukupno po reakciji:</b>			<b>10 μL</b>

Reakcija se odvijala u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD) u sljedećim uvjetima: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 min, 4°C ∞. cDNA smo razrijedili s 60 μL kvarcne vode do konačne koncentracije (25 ng/μL) i pohranili do daljnje analize pri -20°C .

### 3.4.3. Kvantitativni PCR (qPCR, *real-time* PCR)

Ekspresiju pojedinih gena u uzorcima određivali smo metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom, qPCR (od engl. *quantitative polymerase chain reaction*) na kalupu cDNA. Ova metoda podrazumijeva eksponencijalno povećavanje produkta reakcije svakim novim ciklusom što se prati interkalacijom fluorescentne boje *SYBR green* unutar novonastalih lanaca DNA ili hidrolizirajućih sonda *TaqMan* obilježenih fluorescencijskim bojama. S obzirom da se svakim ciklusom fluorescencija povećava, ciklus u kojem je količina DNA dovoljna da fluorescencija poraste iznad praga detekcije zove se Ct vrijednost. Ukoliko neke DNA u uzorku ima više, prije će prijeći prag detekcije, te će njena Ct vrijednost biti manja u odnosu na uzorak s manje DNA. Sve Ct vrijednosti se normaliziraju prema vrijednosti referentnog gena. Uloga referentnog gena je da ispravi eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzoraka. Ekspresija gena izražava se kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen i računa se prema formuli  $2^{-\Delta Ct}$ , gdje je  $\Delta Ct$  razlika u ekspresiji (Ct[ciljni gen]-Ct[referentni gen]).

#### 3.4.3.1. qPCR metodom *SYBR green-a*

Zbog složene organizacije gena *TP53* (opisano u poglavljima 1.1.2. i 1.4.1.) koristili smo prilagođenu metodu *nested* PCR-a koja uključuje dvije uzastopne reakcije PCR: prvu,

pre-amplifikacijsku reakciju dugog dometa, i drugu, qPCR reakciju, kojom određujemo razinu ekspresije specifične izoforme. Kao referentnu vrijednost koristili smo ukupnu ekspresiju gena *TP53*. Reakcijama pre-amplifikacije umnažamo određeni set izoformi - „duge“ i „kratke“ izoforme.

Za „duge“ izoforme tj. varijante mRNA (slika 16: i, ii, iii, iv, v, vi,) u pre-amplifikacijskoj reakciji dugog dometa koriste se početnice P1 i P2 (označene zelenim bojama). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedi qPCR za p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$  (slika 16).

Za „kratke“ izoforme tj. varijante mRNA (slika 16: vii, viii, ix) u pre-amplifikacijskoj reakciji dugog dometa koriste se početnice P3 i P2 (označene zelenim bojama). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedi qPCR za  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  (slika 16).

Popis početnica koje smo koristili u pre-amplifikacijskim reakcijama naveden je u tablici 11, dok je na slici 16 prikazano mjesto vezanja početnica. Sastav pre-amplifikacijskih reakcija prikazan je u tablici 12. Početnice smo zagrijali 5 min pri 90°C da se uklone sekundarne strukture i međusobno sparene početnice (engl. *primer-dimeri*).

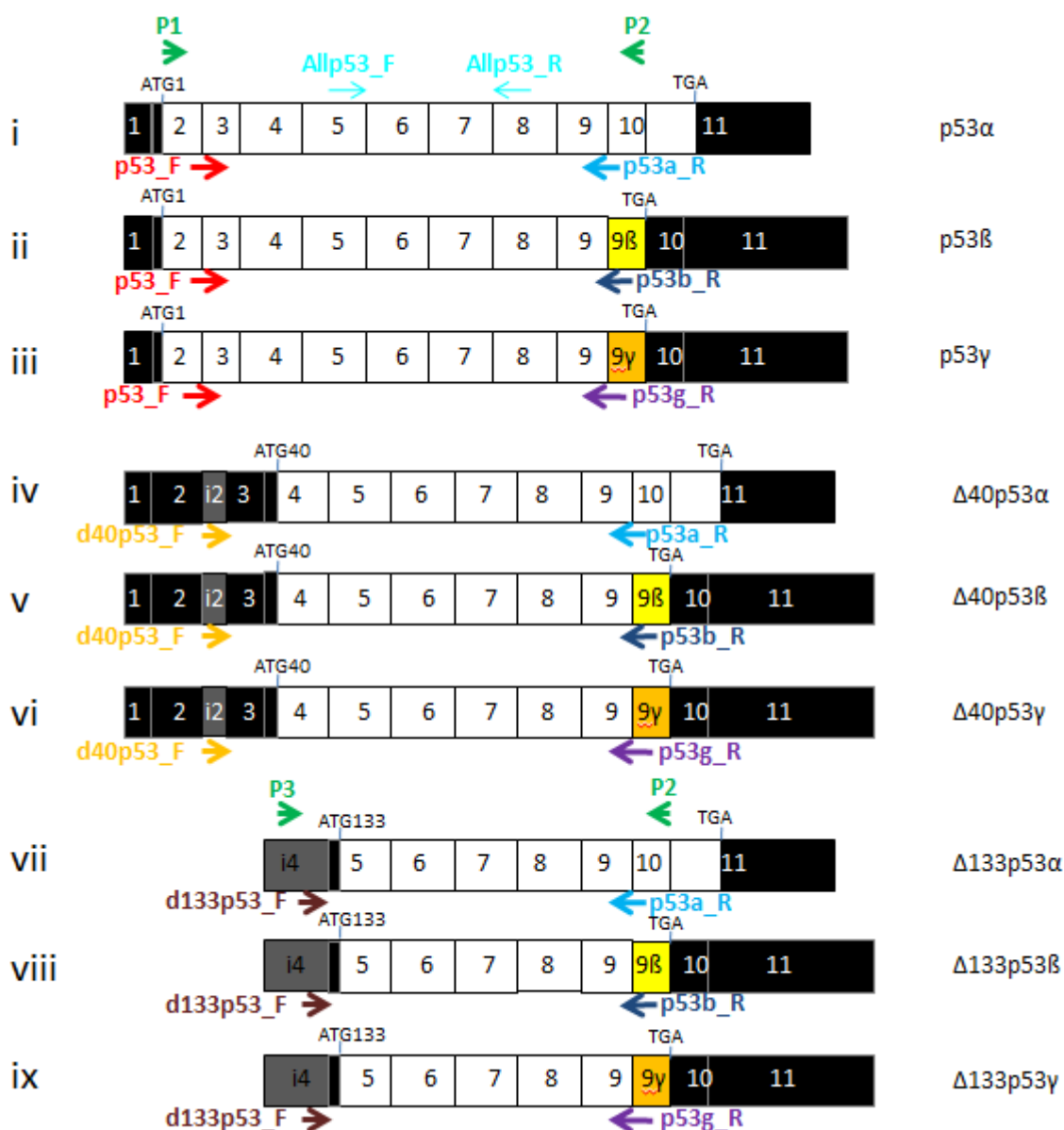
**Tablica 11: Popis početnica za pre-amplifikacijsku reakciju**

Izoforma	Početnice	Slijed nukleotida u smjeru 5'-3'
<i>duge</i>	P1	GTCACTGCCATGGAGGAGCCGCA
	P2	CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG
<i>kratke</i>	P3	TTCCAGTTGCTTTATCTGTTCACTTGT
	P2	CTTCCCAGCCTGGGCATCCTTG

**Tablica 12: Sastav pre-amplifikacijske reakcije**

Reagensi	Pre-amplifikacija dugih izoformi		Pre-amplifikacija kratkih izoformi	
	Konačna koncentracija u reakciji	Volumen ( $\mu$ L)	Konačna koncentracija u reakciji	Volumen ( $\mu$ L)
1 $\times$ GoTaq Colorless Master Mix	1 $\times$	12,5 $\mu$ L	1 $\times$	12,5 $\mu$ L
Kvarcna voda		9,5 $\mu$ L		8,5 $\mu$ L
Početnica F	0,4 mM	1 $\mu$ L	0,4 mM	1 $\mu$ L
Početnica R	0,4 mM	1 $\mu$ L	0,4 mM	1 $\mu$ L
Kalup cDNA *	1 ng/ $\mu$ L	1 $\mu$ L	2 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L
<b>Ukupni volumen</b>		<b>25 <math>\mu</math>L</b>		<b>25 <math>\mu</math>L</b>

\*u reakciji pre-amplifikacije dugih izoformi koristili smo 25 ng DNA, dok smo u reakciji pre-amplifikacije kratkih izoformi koristili 50 ng DNA.



**Slika 16: Nested qPCR za određivanje ekspresije izoformi gena TP53.** Za „duge“ izoforme (i, ii, iii, iv, v, vi) u pre-amplifikacijskoj reakciji dugog dometa koriste se početnice P1 i P2 (označene zelenom bojom). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedi qPCR za izoforme p53α, p53β, p53γ, Δ40p53α, Δ40p53β, Δ40p53γ. Za „kratke“ izoforme (vii, viii, ix) u pre-amplifikacijskoj reakciji kratkog dometa koriste se početnice P3 i P2 (označene zelenom bojom). Nakon pre-amplifikacijske reakcije slijedi qPCR za Δ133p53α, Δ133p53β, Δ133p53γ.

Pre-amplifikacijska reakcija odvijala se u uređaju za PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema sljedećim uvjetima: 95°C tijekom 3 min i zatim 35 ciklusa (94°C 30 s; 60°C 40 s; 72°C 90 s); te konačno 72°C 7 min. Nakon završetka reakcije, pre-amplificirane duge izoforme razrijedili smo 400 puta, dok smo pre-amplificirane kratke izoforme razrijedili 200 puta.



Nakon reakcija pre-amplifikacije slijedila je reakcija qPCR metodom *SYBR green*. Popis početnica prikazan je u tablici 13, a sastav reakcijskih smjesa qPCR reakcija u tablici 14. Koristili smo Takyon Low Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgija). Reakcije qPCR izvodili smo u duplikatima, a uz reakcijske smjese za svaki gen radili smo i dodatnu negativnu kontrolu bez cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju CFX96 Real-Time PCR (BioRad, SAD) prema sljedećim uvjetima: 95°C tijekom 3 min; zatim 40 ciklusa (95°C 15 s, 63°C 20 s; 72°C 10 s) te reakcija disocijacije (taljenja) u rasponu od 72°C do 95°C s porastom od 0,5°C svakih 5 sekundi.

Tablica 13: Popis početnica za reakciju qPCR

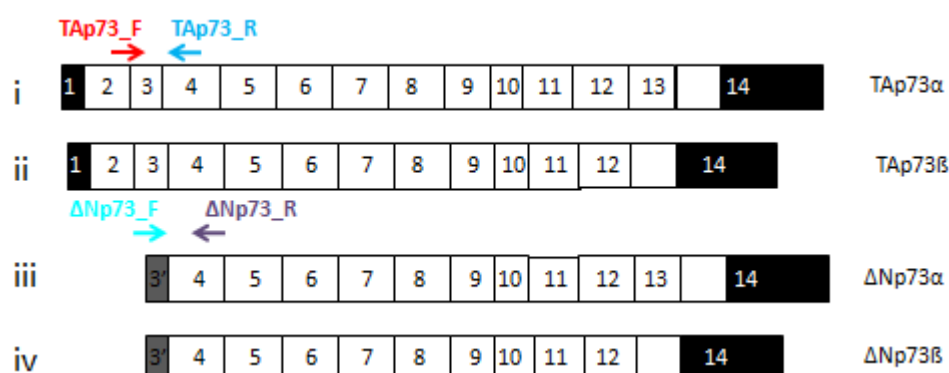
Izoforma	Početnice	Slijed nukleotida u smjeru 5'-3'
p53 $\alpha$	p53_F	AGACCTATGGAAACTACTTCCT
	p53a_R	CTCACGCCCACGGATCTGA
p53 $\beta$	p53_F	AGACCTATGGAAACTACTTCCT
	p53b_R	AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT
p53 $\gamma$	p53_F	AGACCTATGGAAACTACTTCCT
	p53g_R	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
$\Delta$ 40p53 $\alpha$	d40p53_F	GATCCATTGGAAGGGCAGGCC
	p53a_R	CTCACGCCCACGGATCTGA
$\Delta$ 40p53 $\beta$	d40p53_F	GATCCATTGGAAGGGCAGGCC
	p53b_R	AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT
$\Delta$ 40p53 $\gamma$	d40p53_F	GATCCATTGGAAGGGCAGGCC
	p53g_R	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
$\Delta$ 133p53 $\alpha$	d133p53_F	ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG
	p53a_R	CTCACGCCCACGGATCTGA
$\Delta$ 133p53 $\beta$	d133p53_F	ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG
	p53b_R	AAGCTGGTCTGGTCCTGAAGGGT
$\Delta$ 133p53 $\gamma$	d133p53_F	ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAG
	p53g_R	TCGTAAGTCAAGTAGCATCTGAAGG
sve p53	allp53_F	CCATCTACAAGCAGTCACAGCA
	allp53_R	TTCTTGCGGAGATTCTCTTCCT

Tablica 14: Sastav reakcijske smjese reakcije qPCR

Reagensi	Konačna koncentracija u reakciji	Volumen ( $\mu$ L)
2 $\times$ Takyon Low Rox SYBR MasterMix dTTP Blue		5 $\mu$ L
Kvarcna voda		3,2 $\mu$ L
Početnica F	0,4 mM	0,4 $\mu$ L
Početnica R	0,4 mM	0,4 $\mu$ L
Kalup DNA		1 $\mu$ L
<b>Ukupni volumen</b>		<b>10 <math>\mu</math>L</b>

### 3.4.3.2. qPCR koristeći hidrolizirajuće *TaqMan* sonde

Za detekciju izoformi gena *TP73* (TAp73 i ΔNp73) na kalupu cDNA koristili smo sonde obilježene fluorescentnom bojom TAMRA. Kao referentni gen koristili smo TATA-vezujući protein (*TBP*). Popis početnica i sondi (Matabion, Njemačka) naveden je u tablici 15, dok je mjesto vezanja početnica prikazano na slici 17. Sastav reakcijske smjese naveden je u tablici 16.



**Slika 17: Lančana reakcija polimerazom za određivanje ekspresije gena *TP73*.** Za skupinu izoformi TAp73 u qPCR-u koriste se početnice TAp73\_F i TAp73\_R, dok se za izoforme ΔNp73 koriste početnice ΔNp73\_F i ΔNp73\_R.

**Tablica 15: Popis početnica i sondi za analizu gena *TP73***

Naziv	Slijed nukleotida u smjeru 5'-3' sondi obilježenih fluorescentnom bojom TAMRA	Početnice	Slijed nukleotida u smjeru 5'-3'
TAp73	CACCTACTTCGACCTTCCCCAGTCAAGC	F	CCTCTGGAGCTCTCTGGAACC
		R	TGGGCCATGACAGATGTAGTCA
ΔNp73	TGACCCCGCACGGCACCTC	F	GCGCCTACCATGCTGTACGT
		R	AGATTGAACCTGGGCCGTGG
TBP	TGTGCACAGGAGCCAAGAGTGAAGA	F	CACGAACCACGGCACTGATT
		R	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC

**Tablica 16: Sastav reakcijske smjese za reakciju qPCR**

Reagens	Konačna koncentracija u reakciji	Volumen (μL)
1 × TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD)	1 ×	12,5 μL
Kvarcna voda		2,375 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 (125 ng)	5 ng/μL	5 uL
<b>Ukupni volumen</b>		<b>25 μL</b>

Reakcije smo izvodili u duplikatima, a za svaki gen radili smo i negativnu kontrolu u koju nismo dodali cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema sljedećim uvjetima: 95°C 10 min; zatim 40 ciklusa (95°C 15 s, te 60°C 1 min u kojem se mjerila količina fluorescencije).

### 3.4.3.3. qPCR koristeći *TaqMan* ekspresijske komplete

Za određivanje ekspresije gena obitelji NME (*NME1* i *NME2*), te GLI (*GLI1*, *GLI2* i *GLI3*) koristili smo dostupne ekspresijske komplete *TaqMan* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao referentne gene koristili smo  $\beta$ -glukoronidazu (*GUSB*) i *TBP*. Popis ekspresijskih kompleta prikazan je u tablici 17, a sastav reakcijske smjese qPCR u tablici 18.

Tablica 17: Popis ekspresijskih kompleta

Gen	<i>TaqMan</i> ekspresijski komplet
<i>NME1</i>	Hs00264824_m1
<i>NME2</i>	Hs00897133_g1
<i>GLI1</i>	Hs01110766_m1
<i>GLI2</i>	Hs01119974_m1
<i>GLI3</i>	Hs00609233_m1
<i>TBP</i>	Hs00427620_m1
<i>GUSB</i>	Hs00939627_m1

Tablica 18: Sastav reakcijske smjese za reakciju qPCR

Reagensi	Konačna koncentracija u reakciji	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
2 $\times$ <i>TaqMan</i> Gene Expression Master Mix	1 $\times$	10 $\mu\text{L}$
20 $\times$ <i>TaqMan</i> Gene Expression Assay	1 $\times$	1 $\mu\text{L}$
Kvarcna voda		5 $\mu\text{L}$
Kalup cDNA (100 ng)	5 ng/ $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
<b>Ukupni volumen</b>		<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>

Reakcije smo izvodili u duplikatima, a za svaki gen smo radili i dodatnu negativnu kontrolu u koju nismo stavili cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju za kvantitativni PCR Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) prema sljedećim uvjetima: 95°C tijekom 10 min; zatim 40 ciklusa (95°C 15 s te 60°C 1 min kada se mjerila količina fluorescencije).

## 3.5. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot

### 3.5.1. Izdvajanje proteina

Za izdvajanje proteina koristili smo dvije različite metode, jednu za izdvajanje proteina iz staničnih kultura, a drugu za izdvajanje iz tkiva.

Da bi izdvojili proteine iz melanocita i stanica melanoma čovjeka, u taloge stanica dodali smo 100  $\mu$ L PBS-a s inhibitorima proteaza (*Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*; Roche, Švicarska). Stanice u uzorku smo razbijali pomoću ultrazvuka  $2 \times 10$  s pomoću ultrazvučne sonde promjera 1 mm, amplitudom 80 (LABSONIC® M, Montreal Biotech, Kanada). Na ovaj se način rastrgaju stanične membrane i oslobađaju proteini koje smo pohranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Da bi izdvojili proteine iz tkiva metastatskog melanoma čovjeka i pripadajuće zdrave kože najprije smo na oko 50 mg smrznutog tkiva dodali pufer za izolaciju proteina iz tkiva (50 mM TRIS-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Na deoksikolat; 1% NP-40; 0,5% mM EDTA; 100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 0,1% DTT). Sterilnim škalicama tkivo smo usitnili na što manje komadiće, te stanice razbili ultrazvukom 4 puta po 15 s pomoću ultrazvučne sonde promjera 3 mm, amplitudom 80. Uzorke smo zatim centrifugirali 10 min pri  $12\,500 \times g$  i  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo prebacili u novu mikroeprijetu i pohranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.2. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA i priprema uzoraka za elektroforezu

Koncentraciju ukupnih proteina u uzorcima određivali smo kompletom BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD). Na pločicu s 96 bunarića nanosili smo po 20  $\mu$ L otopine albumina iz goveđeg seruma (BSA, od engl. *bovine serum albumine*) u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koje su dobivene serijskim razrijeđivanjem matične otopine koncentracije 2,0  $\text{mg}/\text{mL}$  (Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD) u destiliranoj vodi, zatim 20  $\mu$ L destilirane vode kao negativne kontrole, te na kraju razrijeđene uzorke proteina (2  $\mu$ L uzorka u 18  $\mu$ L destilirane vode). Sve smo radili u duplikatu. Potom smo u svaki bunarić dodali 200  $\mu$ L reagensa iz kompleta BCA Protein Assay Kit koji smo pripremili miješanjem otopine A i B u omjeru 50:1. Pločicu smo

inkubirali 30 min pri 37°C u vodenoj kupelji tip 1083 (GFL, Njemačka), a nakon toga smo izmjerili apsorbanciju pri 570 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice Multiskan MS (Labsystems, Finska).

Na temelju podataka apsorbancije otopina BSA različitih koncentracija izradili smo baždarnu krivulju pomoću koje smo odredili koncentraciju ukupnih proteina u pojedinom uzorku.

Ovisno o obitelji proteina, uzeli smo 25 ili 50 µg ukupnih proteina i dodali im određeni volumen 4 puta koncentriranog pufera za nanošenje uzoraka (4 × LB, od engl. *loading buffer*; 0,2 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 M DTT; 8% SDS; 40% glicerol; 0,001% bromfenolno plavilo). Uzorke smo potom grijali 5 min pri 96°C čime se pospješuje denaturacija proteina.

### 3.5.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida

Proteine smo razdvojili na temelju njihove veličine koristeći natrijev dodecil sulfat-elektroforezu u poliakrilamidnom gelu ili SDS-PAGE (od engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). Ovaj sustav temelji se na denaturirajućem djelovanju detergenta SDS-a u kojem se jedna molekula SDS-a veže na dvije aminokiseline maskirajući tako njihov naboj. To za posljedicu ima da se proteini u električnom polju razdvajaju isključivo na temelju razlike u njihovoj molekularnoj masi.

Sustav koji smo koristili je diskontinuirana elektroforeza koja se sastoji od donjeg gela za razdvajanje uzoraka i gornjeg gela za sabijanje uzoraka (tablica 19). Gelovi se međusobno razlikuju po sastavu i pH-vrijednosti. Koristili smo 7%-tni gel za razdvajanje proteina velikih molekularnih masa (250-50 kDa), te 11%-tni gel za razdvajanje proteina malih molekularnih masa (50-15 kDa). Tijek elektroforeze pratili smo pomoću proteinskog markera Precision Plus Protein Standards Dual Color (BioRad, SAD).

Tablica 19: Sastav smjese za poliakrilamidne gelove

Sastav	Volumen u 7%-tnom gelu za razdvajanje	Volumenu 11%-tnom gelu za razdvajanje	Volumen u 5%-tnom gelu za sabijanje
reH <sub>2</sub> O	4,95 mL	3,65 mL	2,7 mL
Otopina akrilamida i bisakrilamida (30%)	2,35 mL	3,65 mL	0,67 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL	2,5 mL	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	0,5 mL
10%-tna otopina SDS	100 µL	100 µL	40 µL
10%-tna otopina amonijevog persulfata	100 µL	100 µL	40 µL
TEMED	7 µL	4 µL	4 µL
<b>Ukupni volumen gela</b>	<b>10 mL</b>	<b>10 mL</b>	<b>4 mL</b>

\*volumen dovoljan za izlivanje jednog gela veličine 10 × 7 cm

Koristili smo uređaj za elektroforezu Mini-Protean III (BioRad, SAD). Elektroforeza je tekla u puferu za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS) pri konstantnom naponu od 90 V dok su uzorci putovali gelom za sabijanje, a pri 110 V dok su uzorci putovali gelom za razdvajanje.

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

Nakon završetka elektroforeze proteine smo prenijeli na nitroceluloznu membranu Protran BA 85 (Whatman<sup>TM</sup>, GE Healthcare, SAD) veličine pora 0,2 µm u puferu za prijenos (200 mM Tris, 1,5 M glicin, 20% metanol) tijekom 90 min pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA ili tijekom 16 sati pri konstantnom naponu od 12 V, ovisno o veličini proteina koje smo željeli odrediti, u uređaju za prijenos Mini-PROTEAN III (BioRad, SAD).

### 3.5.5. Bojanje i blokiranje membrane

Nakon prijenosa proteina, inkubirali smo membranu u otopini za bojanje naftolno plavilo (10% metanol, 2% octena kiselina, 0,1% naftolno plavilo; Sigma-Aldrich, SAD) ili Ponceau S (0,5% Ponceau S; Sigma-Aldrich, SAD, 10% ledena octena kiselina). Membrane bojane naftolnim plavilom ispirali smo u otopini za odbojavanje (otopina 7%-tne octene kiseline i 40%-tnog metanola u vodi), dok smo membrane bojane Ponceau S odbojavali u

puferu  $1 \times$  TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20). Odbojavanjem naftalnog plavila isprali smo svu boju vezanu za membranu, dok su proteini ostali obojeni i vidljivi kao plave vrpce na svjetloj membrani. S druge strane, odbojavanjem Ponceau S isprali smo svu boju, i onu vezanu za membranu i onu vezanu za proteine.

Nakon ispiranja membranu smo blokirali u puferima za blokiranje (5% obrano mlijeko u puferu  $1 \times$  TBST ili 5% obrano mlijeko u puferu  $1 \times$  PBST) tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi uz zibanje, ovisno o proteinima koje smo proučavali.

### 3.5.6. Imunodetekcija proteina na nitroceluloznoj membrani

Nakon blokiranja membranu smo inkubirali u primarnom protutijelu. Koristili smo dvije tehnike, ovisno o kvaliteti primarnog protutijela i količini proteina od interesa. Za većinu proteina koristili smo klasičan Western blot u dva stupnja, dok smo za detekciju specifičnih izoformi p53 (beta i gama) koristili Western blot u tri stupnja.

Membranu smo inkubirali u otopini specifičnog primarnog protutijela preko noći pri  $4^{\circ}\text{C}$  na zibalici, te potom isprali  $3 \times 10$  min u puferu  $1 \times$  TBST uz zibanje. Popis korištenih primarnih protutijela prikazan je u tablici 20. Slijedilo je inkubiranje membrane tijekom 60 min pri sobnoj temperaturi u otopini sekundarnog protutijela specifičnog za vrstu primarnog protutijela na koji je vezan enzim peroksidaza iz hrena, te ponovno ispiranje  $3 \times 10$  min u puferu  $1 \times$  TBST. Ovisno o podrijetlu primarnog protutijela koristili smo sekundarno protutijelo. Popis korištenih sekundarnih protutijela prikazan je u tablici 21.

Za detekciju izoformi p53 beta i gama koristili smo Western blot u tri stupnja. Nakon inkubacije u otopini specifičnog primarnog protutijela, membranu smo blokirali u puferu za blokiranje tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi uz zibanje. Zatim smo ju inkubirali tijekom 60 min pri sobnoj temperaturi u otopini specifičnog sekundarnog protutijela na koji nije vezana peroksidaza iz hrena, te ponovno blokirali u puferu za blokiranje tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi uz zibanje. Slijedila je inkubacija membrane u otopini specifičnog sekundarnog protutijela na koji je vezan enzim peroksidaza iz hrena tijekom 60 min pri sobnoj temperaturi i potom ispiranje  $3 \times 10$  min u puferu  $1 \times$  PBST.

Tablica 20: Popis primarnih protutijela korištenih u imunodetekciji

Naziv	Porijeklo	Razrijeđenje	Izvor	Epitop	Prepoznaje proteine
<b>421</b>	Miš	1:1000	Dobivena ljubaznošću dr.sc. J.C. Bourdona, Dundee, UK	372-379 aminokiseline (ekson 11)	Prepoznaje izoforme p53 $\alpha$ , $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , $\Delta$ 160p53 $\alpha$
<b><math>\beta</math> sheep</b>	Ovca	1:5000		332-341 aminokiseline (ekson 9 $\beta$ )	Prepoznaje izoforme p53 $\beta$ , $\Delta$ 40p53 $\beta$ , $\Delta$ 133p53 $\beta$ , $\Delta$ 160p53 $\beta$
<b>KJC8</b>	Kunić	1:1000		332-346 aminokiseline (ekson 9 $\gamma$ )	Prepoznaje izoforme p53 $\gamma$ , $\Delta$ 40p53 $\gamma$ , $\Delta$ 133p53 $\gamma$ , $\Delta$ 160p53 $\gamma$
<b>KJCA<math>\gamma</math></b>	Kunić	1:500		11-65(eksoni 2, 3, 4); 290-301(eksoni 8 i 9); 363-393(eksoni 10 i 11)	Prepoznaje sve izoforme proteina p53
<b>SAPU</b>	Ovca	1:5000		181-190 aminokiseline (eksoni 5 i 6)	
<b>DO11</b>	Miš	1:1000			
<b>DO1</b>	Miš	1:2000	Santa Cruz Biotechnologies, SAD	20-25 aminokiseline (ekson 2)	Prepoznaje izoforme p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$
<b>ER15</b>	Miš	1:500	BD Pharmingen, SAD	367-380aminokiseline (eksoni 9 i 10)	Prepoznaje sve izoforme proteina p73
<b>GC15</b>	Miš	1:500			
<b>EP436Y</b>	Kunić	1:2000	Abcam, V. Britanija	50-150 aminokiseline (eksoni 3 i 4)	
<b>NME1/2</b>	Kunić	1:2000	Dobiveno ljubaznošću dr.sc. M. Herak Bosnar	nekoliko epitopa duž sekvence	Prepoznaje protein NME1 i NME2
<b>GLI1</b>	Kunić	1:1000	Cell Signaling, SAD	oko 812aminokiseline (ekson 10)	Prepoznaje izoforme Gli1 (160, 130 i 118kDa)
<b>GLI2</b>	Kunić	1:1000	Aviva Systems Bilogy, SAD	600-649 aminokiseline (ekson 12)	Prepoznaje izoforme Gli2 (250 i 133kDa)
<b>GLI3</b>	Kunić	1:900	Proteintech, SAD	na N kraju proteina	Prepoznaje izoforme Gli3_A i Gli3_R
<b><math>\beta</math>-AKTIN</b>	Miš	1:2000			Prepoznaje $\beta$ -aktin

Za detekciju signala na membrani koristili smo komplete za detekciju kemiluminiscencijom SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate i SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (oba Pierce, Thermo Fisher Scientific, SAD), te Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate (PerkinElmer, SAD). Za detekciju signala koristili smo uređaj za vizualizaciju Alliance 4.7 (UVItec, Velika Britanija).



Tablica 21: Popis sekundarnih protutijela korištenih u imunodetekciji

Naziv	Razrijeđenje	Izvor	Supstrat
Kozje protumišje <i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ Fragment Specific</i>	1:5000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Kozje protumišje <i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Light Chain Specific</i>	1:5000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Mišje protukuničje <i>Peroxidase IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Rabbit IgG, Light Chain Specific</i>	1:5000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Kuničje protumišje <i>Amersham ECL Antimouse IgG, HRP-linked whole antibody</i>	1:3000	GE HealthCare, UK	HRP
Kozje protukuničje <i>Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole antibody</i>	1:3000	Cell Signaling Technology, SAD	HRP
Magareće protuovčje <i>Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L)</i>	1:10000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Magareće protukozje <i>Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)</i>	1:3000	Jackson Immuno Research, SAD	HRP
Kozje protužečje <i>Unconjugated AffiniPure Goat Anti Rabbit IgG (H+L)</i>	1:500	Jackson Immuno Research, SAD	-

### 3.6. Analiza proteinskih interakcija metodama ko-immunoprecipitacije

Metoda imunoprecipitacije omogućava izdvajanje proteina od interesa iz ukupnih proteina u lizatu stanica koristeći specifično protutijelo za taj protein. Za istraživanje interakcija između dva ili više proteina koristi se metoda ko-immunoprecipitacije (coIP). Ona se temelji na činjenici da se ciljni protein, koji može biti u kompleksu s drugim proteinima, veže za specifično protutijelo te se tako cijeli kompleks proteina može izdvojiti iz staničnog lizata. Kompleksi proteina analiziraju se metodom Western blot (opisano u poglavlju 3.5.). S obzirom da izoforme proteina p53 i p73 te imunoglobulinski lanci specifičnih protutijela dijele molekulsku masu, kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati (engl. *crosslink*) sekundarno protutijelo korišteno u ovim pokusima proizvedeno je protiv lakih lanaca imunoglobulina IgG.

Proteine iz stanica melanoma čovjeka izolirali smo koristeći pufer TENN (1 M Tris pH 7,5; 0,5M EDTA pH 8,0; 5M NaCl; NP-40). Ukratko, na talog stanica dodali smo 100 µL

pufera TENN s inhibitorima proteaza. Stanice u uzorku smo razorili djelovanjem ultrazvuka  $2 \times 10$  s pomoću ultrazvučne sonde promjera 1 mm, amplitudom 80, te potom centrifugirali tijekom 20 min pri  $13\,000 \times g$  i  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant u kojemu su proteini, prebacili smo u novu mikroeprevetu, nakon čega smo, određivali koncentraciju protein metodom BCA (opisano u poglavlju 3.5.2).

### 3.6.1. Ko-imunoprecipitacija upotrebom agaroznih kuglica

Za analizu interakcija proteina koji nosi privjesak FLAG koristili smo protu-FLAG agarozu (Sigma Aldrich, SAD). Protu-FLAG agarozu je suspenzija agaroznih zrnaca na koje je kovalentno vezano protutijelo protu-FLAG koje stvara interakciju antigen-protutijelo s željenim proteinom koji nosi na sebi privjesak.

Prije same ko-imunoprecipitacije potrebno je pripremiti agarozu. U mikroeprevetu smo stavili  $40\ \mu\text{L}$  dobro izmiješane suspenzije agaroze koju smo ispirali  $3 \times$  puferom TENN i centrifugirali 30 s pri  $12\,000 \times g$  kako bi u potpunosti uklonili pufer u kojem je agarozu bila pohranjena. Nakon ispiranja na protu-FLAG agarozu dodali smo 1 mg ukupnih staničnih proteina, te inkubirali preko noći pri  $4^\circ\text{C}$  na zibalici. Kao kontrolu metode imunoprecipitirali smo protu-FLAG agarozu u lizatu proteina bez rekombinantnog proteina. Sljedećeg dana uzorke smo centrifugirali 30 s pri  $12\,000 \times g$  te taloge uzoraka s agarozom ispirali dva puta PBS-om te PBS-om s 0,05% Tween-20 kako bi se uklonili svi zaostali nespecifično vezani proteini. Nakon posljednjeg ispiranja taloge smo resuspendirali u  $20\ \mu\text{L}$   $2 \times$  pufera LB, te potom grijali 10 min pri  $70^\circ\text{C}$ . Uzorke smo potom razdvojili metodom SDS-PAGE i analizirali metodom Western blot (opisano u poglavljima 3.5.3, 3.5.4. i 3.5.5.).

### 3.6.2. Ko-imunoprecipitacija upotrebom magnetskih zrnaca DynaBeads™ Protein G

Za proučavanje proteina od interesa koji ne nose privjesak FLAG koristili smo magnetska zrnca kovalentno vezana za rekombinantni protein G *DynaBeads Protein G* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Dodavanjem specifičnog protutijela u suspenziju zrnaca protutijelo se veže za protein G svojim Fc-područjem čime dobivamo kompleks protutijela i proteina G vezanog za magnetsko zrnce.

Magnetska zrnca odvojili smo od otopine u kojoj se čuvaju pomoću magnetskog stalka. Otopinu smo uklonili, a zrnca isprali dva puta u PBS-Tween-20 0,01%, te inkubirali s 2 µg specifičnog protutijela otopljenog u otopini PBS-Tween-20 0,01% tijekom 60 min na zibalici. Pomoću magneta odvojili smo magnetska zrnca na koja su vezana protutijela, a višak otopine smo uklonili. Zrnca smo ispirali otopinom PBS-Tween-20 0,01%, te dodali 1 mg ukupnih staničnih proteina i inkubirali preko noći pri 4°C uz zibanje. Kao kontrolu metode imunoprecipitirali smo uzorke ukupnih proteina bez prisutnosti protutijela. Sljedećeg dana magnetom smo odvojili kuglice, te ih isprali dva puta u PBS-u. Taloge smo resuspendirali u 20 µL 2 × LB, grijali 10 min pri 70°C, razdvojili proteine pomoću SDS-PAGE i analizirali metodom Western blot (opisano u poglavljima 3.5.3, 3.5.4. i 3.5.5.).

### 3.7. Određivanje transkripcijske aktivnosti gena luciferaznim testom

Utjecaj izoformi proteina p53 i p73, te proteina obitelji NME i GLI na transkripcijsku aktivnost p53 određivali smo testom aktivnosti luciferaze. Luciferaza se koristi kao gen dojavljivač, a pogodna je za analizu ekspresije gena i staničnih procesa koji su vezani za ekspresiju gena uključujući i transkripcijsku aktivnost te interakcije proteina. Luciferaza emitira svjetlost tijekom oksidacije kemijskog supstrata luciferina, a količina emitiranog svjetla kao mjera luciferazne aktivnosti mjeri se luminometrom.

Koristili smo plazmidni vektor PG13 s luciferaznim genom iz krijesnice, *firefly*, kao dojavljivač pod kontrolom promotora koji se sastoji od 13 kopija konsenzusnog slijeda za vezanje p53. Vezanjem za regulatorne regije PG13, protein p53 potiče transkripciju luciferaze. Ko-transficirali smo plazmidni vektor s luciferaznim genom dojavljivačem iz *renille* koji služi za normalizaciju i može se koristiti u kombinaciji s bilo kojim vektorom s luciferazom *firefly*.

Stanice smo nasadili na pločicu s 24 bunarića, 90 000 stanica po bunariću, tako da postignu popunjenost površine od 70%. Idućeg dana stanice smo transficirali odgovarajućim vektorima prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.2.1. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije za proteine p53/p73 i NME, te četrdeset i osam sati za proteine GLI uklonili smo tekuću hranjivu podlogu sa stanica, isprali ih 2 × hladnim PBS-om, te potom na njih nanijeli 100 µL 1 × pufera za lizu (5 × *Passive Lysis Buffer*, Promega SAD; razrijeđen 5 × s deH<sub>2</sub>O) i

ostavili 10 min na tresilici. Koristili smo *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega, SAD) prema uputama proizvođača. Lizat stanica (75  $\mu$ L) prenijeli smo u bijelu pločicu s 96 bunarića i potom dodali 75  $\mu$ L supstrata za luciferazu. Prije očitavanja luciferazne aktivnosti pričekali smo 10 min da se razvije reakcija. Nakon očitavanja luciferazne aktivnosti *firefly*, na pločice smo dodali 75  $\mu$ L supstrata Stop&Glo, pričekali 10 min te mjerili luciferaznu aktivnost *renille* na luminometru (Fluoroscan ascent FL, ThermoFisher Scientific, SAD).

Vrijednost aktivnosti luciferaze dobili smo omjerom vrijednosti kemoluminiscencije nastale tijekom oksidacije kemijskog supstrata za luciferazu *firefly* i luciferazu *renilla*.

### 3.8. Mjerenje apoptoze na protočnom citometru

Utjecaj izoformi proteina p53 i p73, te proteina obitelji NME i GLI na apoptotsku aktivnost p53 određivali smo mjerenjem apoptoze na protočnom citometru. Apoptoza je normalni fiziološki proces uklanjanja oštećenih stanica. U ranoj fazi apoptoze membranski lipid fosfatidilserin (PS, od engl. *phosphatidylserine*) se premješta s unutarnje membrane na vanjsku, dok je kasna faza apoptoze obilježena bubrenjem membrane i cijepanjem DNA.

Komplet za mjerenje apoptoze sastoji se od fluorokromom obilježenog proteina aneksina V i boje propidij jodid (PI) ili 7- aminoaktinomicin D (7AAD) koja se interkalira u DNA. Protein aneksin V ima veliki afinitet prema PS, te stanice pozitivne na aneksin V označavaju stanice u ranoj ili u kasnoj apoptozi. S druge strane, žive stanice su negativne na aneksin V. Nadalje, oštećene stanice su permeabilne za PI ili 7AAD, dok u žive stanice te boje ne ulaze. Stoga se stanice pozitivne na PI ili 7AAD označavaju mrtvima ili jako oštećenima. Na temelju toga, komplet za apoptozu razlikuje tri populacije stanica:

Žive stanice – aneksin V (-) i PI/7AAD (-)

Stanice u ranoj apoptozi – aneksin V (+) i PI/7AAD (-)

Mrtve stanice\* – aneksin V (+) i PI/7AAD (+)

Mrtvima se smatraju one stanice koje su u kasnoj apoptozi ili u nekrozi. Naime, obje vrste stanične smrti su pozitivne na aneksin V i PI/7AAD, te ih stoga ovaj test ne može razlikovati.

Stanice smo nasadili na pločicu s 12 bunarića, 190 000 stanica po bunariću, tako da budu 90% konfluentne. Idućeg dana stanice smo transficirali odgovarajućim vektorima prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.2.1, a 24 sata kasnije smo ih tretirali s 20 nM kamptotecinom. Kamptotecin je protutumorski lijek koji inhibira DNA topoizomerazu I, čime izaziva oštećenja DNA zbog kojih stanica ulazi u apoptozu. Dvadeset i četiri sata kasnije skupili smo sve stanice (mrtve - sakupljajući tekuću hranjivu podlogu sa stanica; žive - tripsinizacijom), te ih centrifugirali tijekom 5 min pri  $1200 \times g$  i  $4^{\circ}\text{C}$ . Talog stanica smo zatim isprali u odgovarajućem volumenu hladnog PBS-a, ponovno centrifugirali, te smo na talog stanica dodali 30  $\mu\text{L}$  Annexin-PI radne otopine (1 mL pufera za inkubaciju, 20  $\mu\text{L}$  otopine propidij jodida i 20  $\mu\text{L}$  otopine Annexin-V-FLUOS; *Annexin-V-FLUOS staining kit* (Roche, Švicarska)). Stanice smo inkubirali 15 min u mraku, nakon čega smo dodali 500  $\mu\text{L}$  pufera za inkubaciju te smo apoptoznu aktivnost analizirali na instrumentu BD FACSCalibur (Becton Dickinson, SAD). Rezultate analize smo prikazali kao postotak pozitivnih stanica u odnosu na kontrolne stanice tretirane vektorom bez konstrukta.

### 3.9. Statistička obrada podataka

Pojedine eksperimentalne rezultate analizirali smo statističkim testovima ovisno o vrsti podataka i njihovoj distribuciji.

Za statističku analizu ekspresije gena u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva koristili smo D'Agostino-Pearsonov test koji je pokazao da vrijednosti dobivene qPCR-om nisu normalno raspodijeljene, zbog čega smo u daljnjim analizama genske ekspresije koristili neparametrijski test Mann-Whitney U.

Za statističku analizu ekspresije proteina u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva koristili smo Wilcoxonov test za sparene uzorke.

Rezultate testa aktivnosti luciferaze i apoptoze podvrgnuli smo analizi varijance (ANOVA) i Tukey HSD testu.

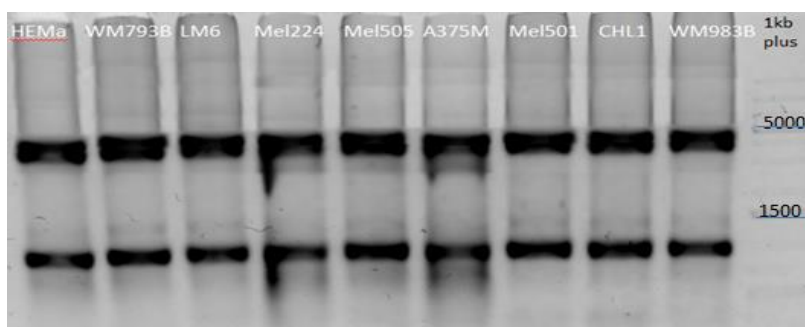
## 4. REZULTATI

U ovoj doktorskoj disertaciji analizirali smo 36 uzorka tkiva metastatskog melanoma čovjeka i njihovo pripadajuće zdravo tkivo, te osam staničnih linija melanoma čovjeka i kontrolnu staničnu liniju melanocita.

Iz stanica svih staničnih linija izolirali smo DNA metodom isoljavanja, te ih potom podvrgnuli sekvenciranju po Sangeru kako bi utvrdili status gena *TP53*. U tablici 2 (poglavlje 3.1.2.) popisane su stanične linije kao i status gena *TP53*. Sekvenciranje je pokazalo da četiri stanične linije imaju mutaciju u genu *TP53*, i to dvije iz skupine primarnog melanoma i dvije iz skupine metastatskog melanoma.

### 4.1. Ekspresija gena obitelji p53, p73, NME i GLI

Iz tkiva metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva, te iz staničnih linija melanoma čovjeka izolirali smo ukupnu RNA. Kvalitetu izolirane RNA provjerili smo elektroforezom u gelu agaroze (1%), te analizirali na uređaju za vizualizaciju Alliance 4.7 (slike 18 i 19).

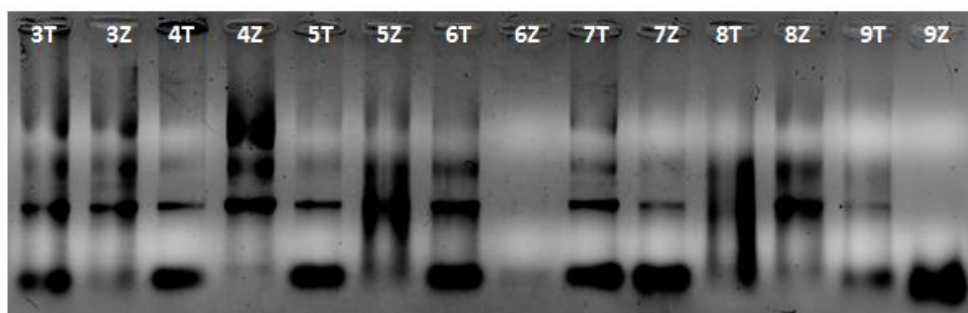


**Slika 18:** Kvaliteta ukupne RNA izolirane iz staničnih linija melanoma čovjeka i kontrolne stanične linije melanocita. Ukupnu RNA izolirali smo koristeći komercijalni komplet, a kvalitetu smo provjerili elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze. Iznad svakog uzorka naveli smo imena staničnih linija.

Slika 18 prikazuje ukupnu RNA izoliranu iz staničnih linija. Iz slike se vidi da je izolirana RNA cjelovita tj. nije razgrađena. Izolirana RNA iz svih tumorskih staničnih linija bila je prikladna za daljnju analizu genske ekspresije dok izolirana RNA iz kontrolne stanične linije melanocita nije bila pogodna za analizu metodom qPCR-a. Iz literature je poznato da je

RNA iz melanocita često kontaminirana melanimom. Melanin je inhibitor polimeraze, te kao takav inhibira reakcije reverzne transkripcije i qPCR. Kako bi se riješili melanina iz uzorka pokušali smo nekoliko metoda izolacije i obrade RNA koje smo pronašli u literaturi (objašnjeno u Tablici 9, poglavlje 3.4.1.).

Niti jedan od navedenih pristupa nije poboljšao rezultate genske ekspresije za melanocite. Stoga u analizama genske ekspresije melanocite nismo koristili.



**Slika 19:** Kvaliteta ukupne RNA izolirane iz tkiva metastatskog melanoma i pripadajućeg zdravog tkiva kože. Ukupnu RNA izolirali smo koristeći reagens TRIzol, a kvalitetu smo provjerili elektorforezom u 1%-tnom gelu agaroze. Slovo T označava tumorsko tkivo, a slovo Z zdravo tkivo (kožu). Brojevi od 3 do 9 označavaju uzorke. Uzorci označeni slovom T imaju manje razgrađenu RNA od uzoraka označenih slovom Z.

Slika 19 prikazuje ukupnu RNA izoliranu iz tkiva metastatskog melanoma (T) i zdravog tkiva kože (Z). Iz slike se vidi da su uzorci izolirane RNA djelomično razgrađeni. Bez obzira na to, izoliranu RNA koristili smo za daljnje analize. Od svih prikupljenih uzoraka, 32 (89%) tumorska i 19 (53%) kontrolnih bilo je pogodno za daljnju analizu genske ekspresije.

Ekspresiju izoformi gena *TP53* i *TP73*, te gena *NME1*, *NME2*, *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* određivali smo metodom qPCR. Prije statističke obrade podataka, dobivene vrijednosti analizirali smo D'Agostino-Pearsonovim testom. Test je pokazao da dobivene vrijednosti nisu normalno raspodijeljene, stoga smo u analizama genske ekspresije koristili neparametrijski test Mann-Whitney U.

#### 4.1.1. Ekspresija izoformi gena *TP53*

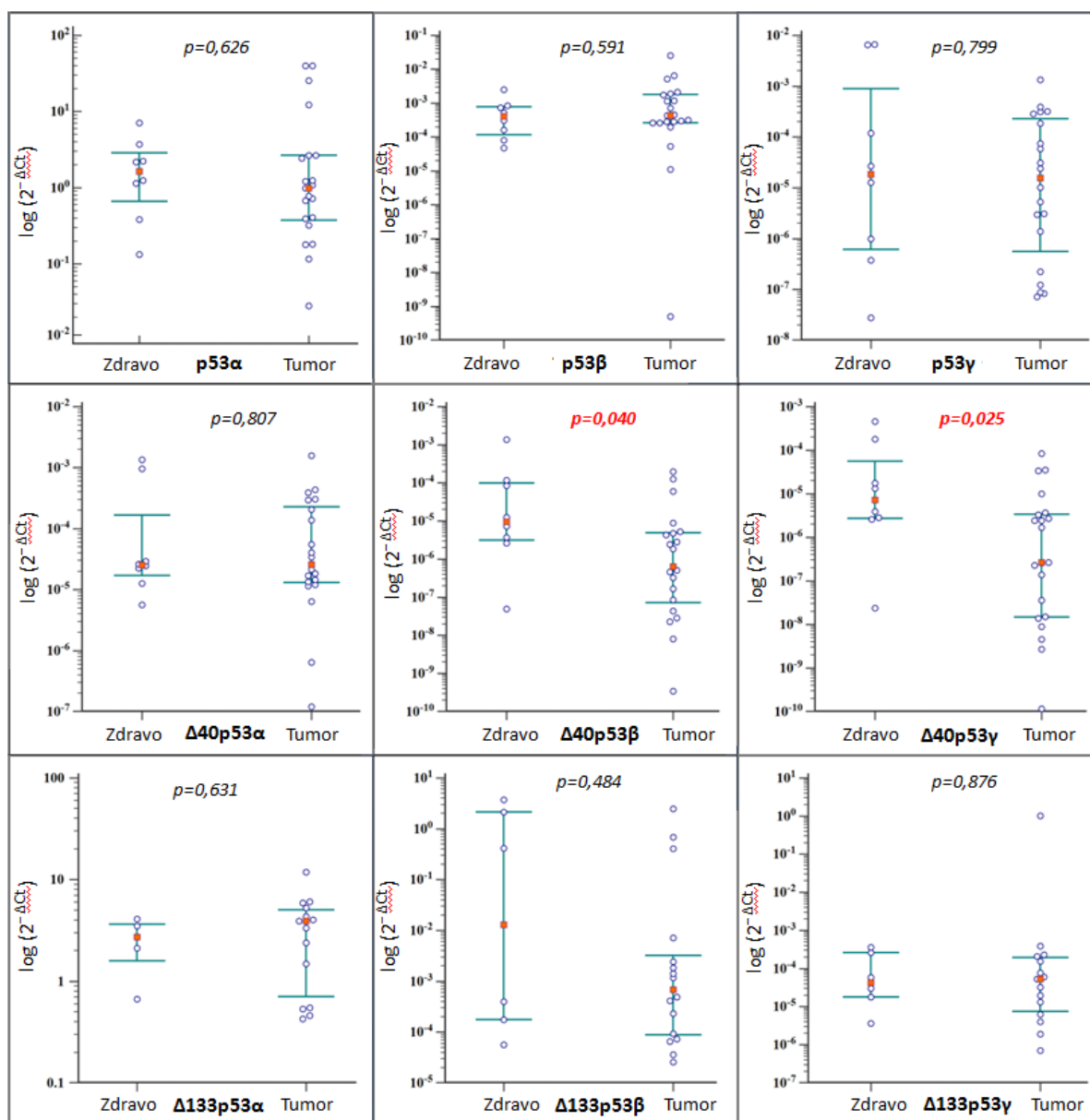
Zbog složene organizacije gena *TP53* (opisano u poglavlju 1.1.2 i 1.4.1) za ekspresiju izoformi koristili smo prilagođenu metodu *nested* PCR koja uključuje dvije uzastopne reakcije PCR, prvu pre-amplifikacijsku reakciju dugog dometa u kojoj umnažamo “duge” i “kratke” izoforme, i drugu qPCR reakciju kojom određujemo razinu ekspresije specifične izoforme (detaljnije opisano u poglavlju 3.4.4.1). Kao referentnu vrijednost za normalizaciju ekspresije pojedinih izoformi koristili smo ukupnu ekspresiju gena *TP53*.

##### 4.1.1.1. Ekspresija izoformi gena *TP53* u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva

Analiza Mann-Whitney U-testa pokazuje da su izoforme podjednako zastupljene kako u tumorskom, tako i u zdravom tkivu, uz izuzetak izoformi  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$  koje su statistički značajno slabije ( $\Delta 40p53\beta$ ,  $p=0,040$ ;  $\Delta 40p53\gamma$ ,  $p=0,025$ ) eksprimirane u tumorskom tkivu (slika 20). Nadalje, analiza “dugih” izoformi pokazuje najvišu ekspresiju  $p53\alpha$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10$ ), nakon čega redom slijede  $p53\beta$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-3}$ ),  $\Delta 40p53\alpha$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-4}$ ),  $p53\gamma$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-5}$ ), te  $\Delta 40p53\beta$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-7}$ ) i  $\Delta 40p53\gamma$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-7}$ ). S druge strane, analiza “kratkih” izoformi pokazuje najvišu ekspresiju izoforme  $\Delta 133p53\alpha$  ( $2^{-\Delta Ct} = 5$ ), nakon čega redom slijede  $\Delta 133p53\beta$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-3}$ ) i  $\Delta 133p53\gamma$  ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-4}$ ) (slika 20).

Općenito gledajući, izoforme *TP53* su slabo eksprimirane u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva izuzev izoformi  $p53\alpha$  i  $\Delta 133p53\alpha$ .

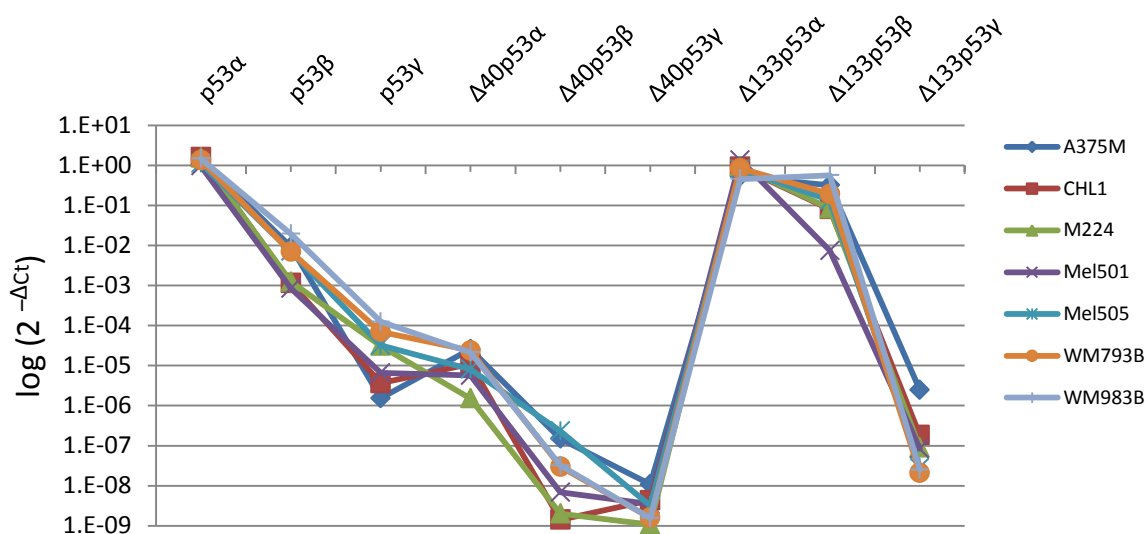




**Slika 20: Relativna ekspresija izoformi gena *TP53* u metastatskom melanomu čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu.** Za analizu ekspresije izoformi koristili smo metodu *nested*-qPCR koja uključuje reakcije preamplifikacije i qPCR. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao relativnu ekspresiju pojedine izoforme normaliziranu prema ukupnoj ekspresiji gena *TP53* ( $\log 2^{-\Delta Ct}$ ). Razliku u ekspresiji gena analizirali smo testom Mann-Whitney U. Navedene p-vrijednosti u crvenoj boji označavaju skupove podataka sa statistički značajnom razlikom u ekspresiji gena. Na slici su označene vrijednosti medijana (crvena točka) i interkvartilnog raspona. Analiza testom Mann-Whitney U pokazuje podjednaku zastupljenost izoformi *TP53* u tumorskom i zdravom tkivu, izuzev izoformi  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$  koje su statistički značajno slabije ekspimirane u tumorima. Općenito, izoforme *TP53* su slabo ekspimirane u testiranim uzorcima izuzev izoformi  $p53\alpha$  i  $\Delta 133p53\alpha$ .

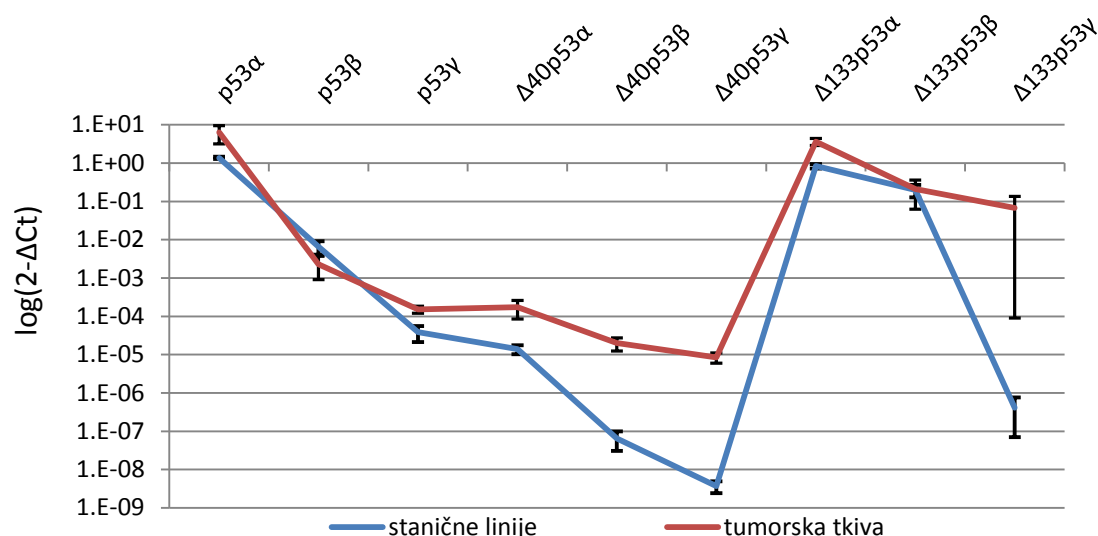
#### 4.1.1.2. Ekspresija gena *TP53* u staničnim linijama melanoma čovjeka

Analiza „dugih“ izoformi pokazuje najvišu ekspresiju izoforme p53 $\alpha$ , nakon čega redom slijede p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$  i  $\Delta$ 40p53 $\gamma$ . Analiza „kratkih“ izoformi pokazuje najvišu ekspresiju izoforme  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , čega slijede  $\Delta$ 133p53 $\beta$  i  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  (slika 21). Stanična linija LM6 ne eksprimira izoforme gena *TP53*, dok ostale stanične linije ekspimiraju sve izoforme.



**Slika 21: Relativna ekspresija izoformi gena *TP53* u staničnim linijama melanoma čovjeka.** Ekspresiju izoformi analizirali smo metodom *nested*-qPCR koja uključuje reakcije pre-amplifikacije i qPCR. Rezultate smo prikazali kao relativnu ekspresiju pojedine izoforme normaliziranu prema ukupnoj ekspresiji gena *TP53* ( $\log 2^{-\Delta Ct}$ ). Stanična linija LM6 ne eksprimira izoforme gena *TP53*, dok sve ostale stanične linije ekspimiraju sve izoforme. Izuzev izoformi p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ , izoforme gena *TP53* su slabo ekspimirane u staničnim linijama.

Nadalje, usporedili smo ekspresije izoformi gena *TP53* u tumorskom tkivu i staničnim linijama - srednju vrijednost ekspresije pojedine izoforme u tumorskim tkivima usporedili smo sa srednjom vrijednošću ekspresije pojedine izoforme u staničnim linijama melanoma. Našli smo da stanične linije i tkiva metastatskog melanoma čovjeka imaju sličnu ekspresiju pojedinih izoformi gena *TP53*. Na slici 22 vidi se da se ekspresija izoformi p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\beta$  u tkivima podudara s ekspresijom u staničnim linijama. Izoforme  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$  i  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  imaju nešto nižu ekspresiju u staničnim linijama u odnosu na tumorska tkiva.



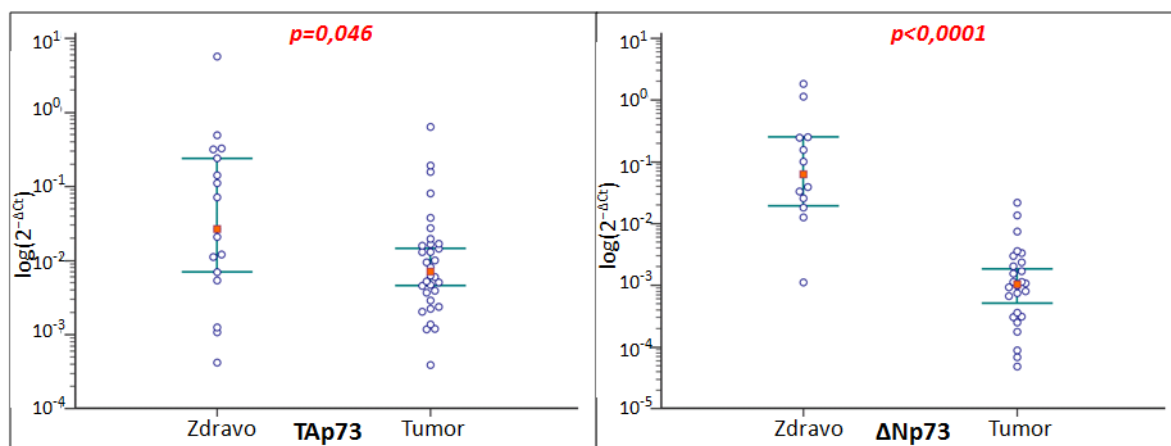
**Slika 22: Usporedba srednjih vrijednosti ekspresije pojedinih izoformi gena *TP53* između tumorskih tkiva i staničnih linija melanoma.** Ekspresiju izoformi gena *TP53* analizirali smo metodom *nested*-qPCR. Ekspresija izoformi p53α, p53β, p53γ, Δ133p53α i Δ133p53β podudara se u staničnim linijama (plava linija) i tumorskom tkivu (crvena linija), dok izoforme Δ40p53α, Δ40p53β, Δ40p53γ i Δ133p53γ pokazuju nešto nižu ekspresiju u staničnim linijama u odnosu na tumorska tkiva.

#### 4.1.2. Ekspresija izoformi gena *TP73*

Kako bismo odredili ekspresiju izoformi gena *TP73*, koristili smo metodu qPCR koja uključuje upotrebu fluorescentno obilježenih hidrolizirajućih proba *Taqman* (opisano u poglavlju 3.4.4.2). Usprkos brojnim izoformama, izoforme proteina p73 mogu se na temelju prisutnosti transaktivacijske domene, transkripcijske aktivnosti i uloge u karcinogenezi podijeliti na dvije glavne skupine: transkripcijski aktivne (izoforme TAp73) i onkogene (izoforme ΔNp73) (detaljnije objašnjeno u poglavlju 1.1.2.). Kao referentnu vrijednost za normalizaciju ekspresije pojedinih izoformi koristili smo ekspresiju gena *TBP*.

##### 4.1.2.1. Ekspresija izoformi gena *TP73* u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva

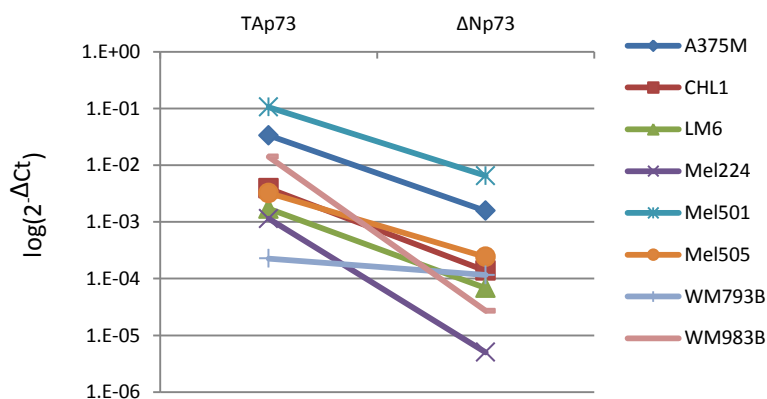
Analiza Mann-Whitney U-testa pokazuje da su obje izoforme, TAp73 i ΔNp73 statistički značajno slabije eksprimirane u tumorskom tkivu (TAp73,  $p=0,046$ ; ΔNp73,  $p<0,0001$ ). Nadalje, izoforme TAp73 u tumorskom tkivu ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-2}$ ) su jače eksprimirane nego izoforme ΔNp73 ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-3}$ ) (slika 23).



**Slika 23: Relativna ekspresija izoformi gena *TP73* u metastatskom melanomu čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu.** Ekspresiju izoformi analizirali smo qPCR-om koristeći hidrolizirajuće probe. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao relativnu ekspresiju pojedine izoforme normaliziranu prema ekspresiji referentnog gena *TBP*. Razliku u ekspresiji gena analizirali smo testom Mann-Whitney U. Navedene p-vrijednosti u crvenoj boji označavaju skupove podataka sa statistički značajnom razlikom u ekspresiji gena. Na slici su označene vrijednosti medijana (crvena točka) i interkvartilnog raspona. Analiza testom Mann-Whitney U pokazuje statistički značajno slabiju zastupljenost TAp73 i ΔNp73 izoformi u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo.

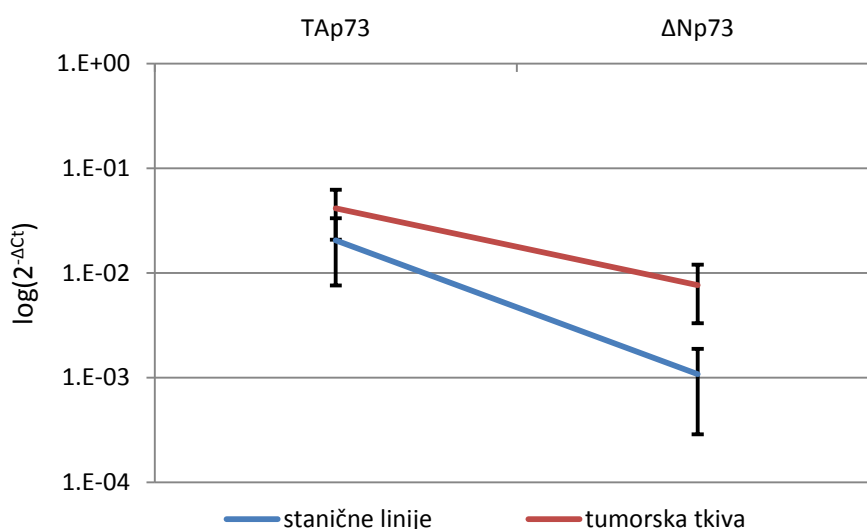
#### 4.1.2.2. Ekspresija izoformi gena *TP73* u staničnim linijama melanoma čovjeka

Kao i u prethodnoj analizi tkiva, analizirali smo dvije skupine izoformi *TP73* - TAp73 i ΔNp73. Izoforme gena *TP73* eksprimirane su u svih osam staničnih linija. U svim staničnim linijama izoforme TAp73 jače su eksprimirane u odnosu na izoforme ΔNp73 (slika 24).



**Slika 24: Relativna ekspresija izoformi gena *TP73* u staničnim linijama melanoma čovjeka.** Ekspresiju izoformi analizirali smo metodom qPCR. Rezultate smo prikazali kao relativnu ekspresiju pojedine izoforme (logaritamska skala) normaliziranu prema ukupnoj ekspresiji referentnog gena *TBP* ( $\log 2^{-\Delta Ct}$ ). Rezultati pokazuju da sve stanične linije eksprimiraju izoforme TAp73 i ΔNp73, s tim da su izoforme TAp73 jače eksprimirane od izoformi ΔNp73.

Nadalje, usporedili smo ekspresije izoformi gena *TP73* u tumorskom tkivu i staničnim linijama, kao što smo to napravili za izoforme p53. Iz slike 25 vidi se da je ekspresija izoformi TAp73 u staničnim linijama i tumorskom tkivu gotovo jednaka dok izoforma  $\Delta$ Np73 pokazuje nešto nižu ekspresiju u staničnim linijama u odnosu na tumorska tkiva.



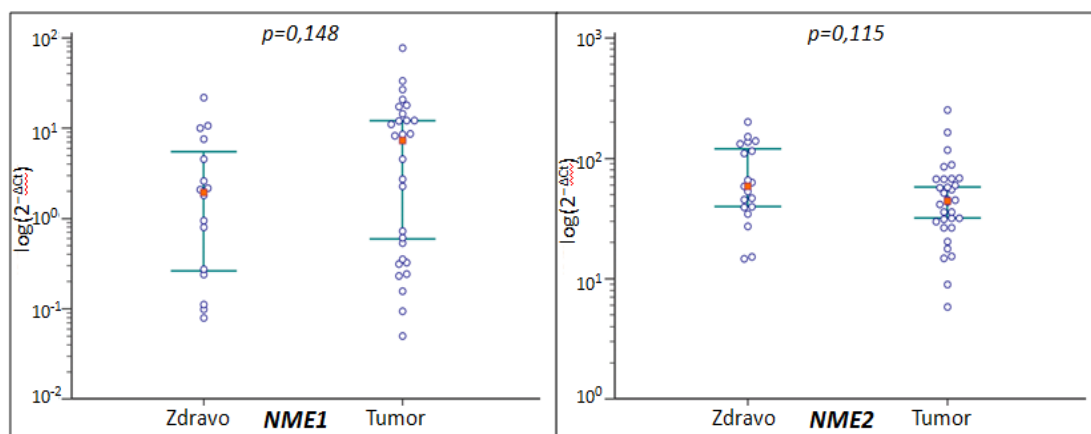
**Slika 25: Usporedba srednjih vrijednosti ekspresije izoformi gena *TP73* u tumorskim tkivima i staničnim linijama melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije izoformi gena *TP73* analizirali smo metodom qPCR. Rezultati pokazuju da je ekspresija izoforme TAp73 gotovo ista u staničnim linijama (plava linija) i tumorskom tkivu (crvena linija), dok je izoforma  $\Delta$ Np73 jače ekspimirana u tumorskim tkivima u odnosu na stanične linije.

### 4.1.3. Ekspresija gena obitelji NME

Za kvantitativno određivanje ekspresije gena iz obitelji NME koristili smo ekspresijske testove *Taqman* za gene *NME1* i *NME2* (objašnjeno u poglavlju 3.4.4.3). Kao referentnu vrijednost za normalizaciju ekspresije pojedinog gena koristili smo ekspresiju gena *TBP* i *GUSB*.

#### 4.1.3.1. Ekspresija gena obitelji NME u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva

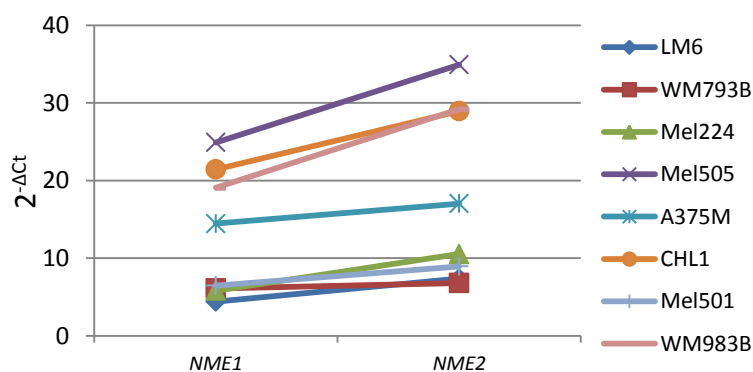
Rezultati Mann-Whitney U-testa pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *NME1* i *NME2* između tumorskog i zdravog tkiva. Nadalje, gen *NME2* pokazuje nešto višu ekspresiju ( $2^{-\Delta Ct} \sim 10^1$ - $10^2$ ) od gena *NME1* ( $2^{-\Delta Ct} = 10^1$ ) u tumorskom tkivu (slika 26).



**Slika 26: Relativna ekspresija gena *NME1* i *NME2* u metastatskom melanomu čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu.** Ekspresiju gena analizirali smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao relativnu ekspresiju pojedinog gena normaliziranu prema ekspresiji referentnih gena *TBP* i *GUSB* ( $\log 2^{-\Delta C_t}$ ). Razliku u ekspresiji gena analizirali smo testom Mann-Whitney U. Na slici su označene vrijednosti medijana (crvena točka) i interkvartilnog raspona. Analiza testom Mann-Whitney U pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *NME1* i *NME2* između tumorskog i zdravog tkiva.

#### 4.1.3.2. Ekspresija gena obitelji NME u staničnim linijama melanoma čovjeka

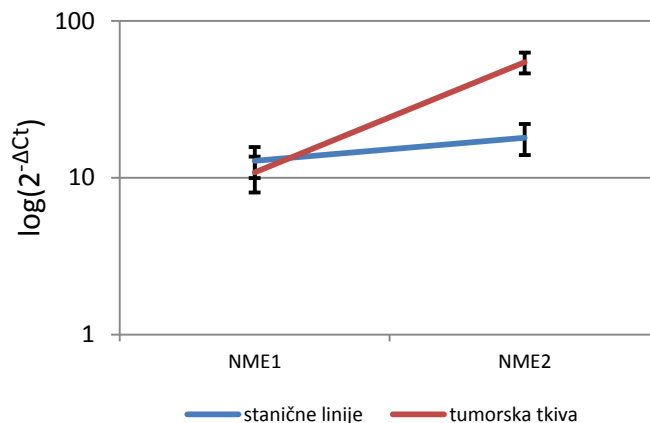
Geni *NME1* i *NME2* eksprimirani su u svih osam staničnih linija a ekspresija gena *NME2* jača je u odnosu na *NME1* (slika 27).



**Slika 27: Relativna ekspresije gena *NME1* i *NME2* u staničnim linijama melanoma čovjeka.** Ekspresiju gena analizirali smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali kao relativnu ekspresiju pojedinog gena normaliziranu prema ekspresiji referentnih gena *TBP* i *GUSB* ( $2^{-\Delta C_t}$ ). Rezultati pokazuju da je ekspresija gena *NME2* jača od ekspresije gena *NME1* u svih osam staničnih linija.

Ekspresiju gena *NME1* i *NME2* usporedili smo u tumorskom tkivu s ekspresijom u staničnim linijama tako da smo usporedili srednje vrijednosti ekspresije pojedinog gena. Iz slike 28 se vidi da je ekspresija gena *NME1* u staničnim linijama i tumorskom tkivu gotovo

jednaka, dok gen *NME2* pokazuje nešto nižu ekspresiju u staničnim linijama u odnosu na tumorska tkiva.



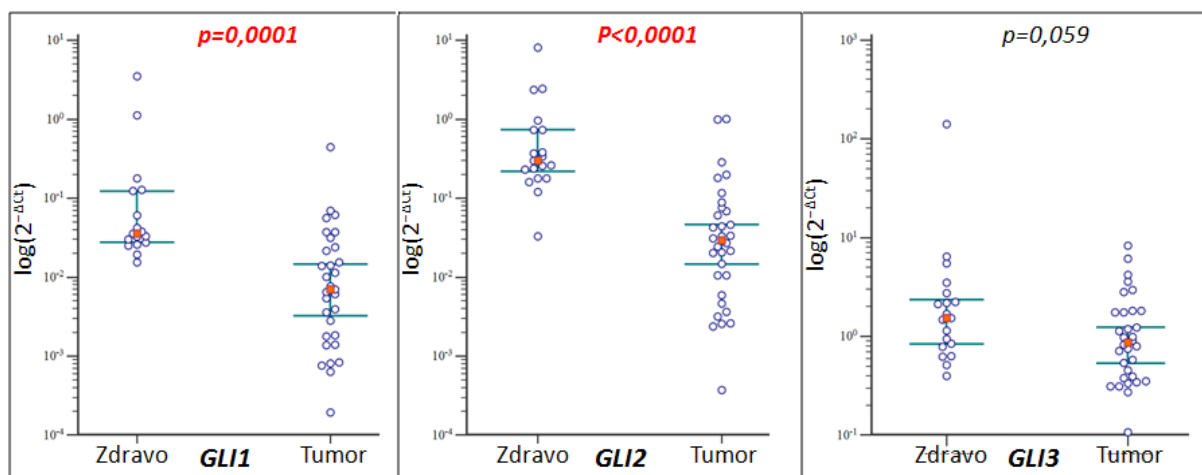
**Slika 28: Usporedba srednjih vrijednosti relativne ekspresije gena *NME1* i *NME2* u tumorskim tkivima i staničnim linijama melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije gena analizirali smo qPCR-om. Rezultati pokazuju da je ekspresija gena *NME1* gotovo ista u staničnim linijama (plava linija) i tumorskom tkivu (crvena linija), dok je gen *NME2* jače eksprimiran u tumorskim tkivima u odnosu na stanične linije.

#### 4.1.4. Ekspresija gena obitelji GLI

Za kvantitativno određivanje ekspresije gena iz obitelji GLI koristili smo ekspresijske testove *Taqman* za *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* (opisano u poglavlju 3.4.4.4). Kao referentnu vrijednost za normalizaciju ekspresije pojedinog gena koristili smo ekspresiju gena *TBP* i *GUSB*.

##### 4.1.4.1. Ekspresija gena obitelji GLI u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva

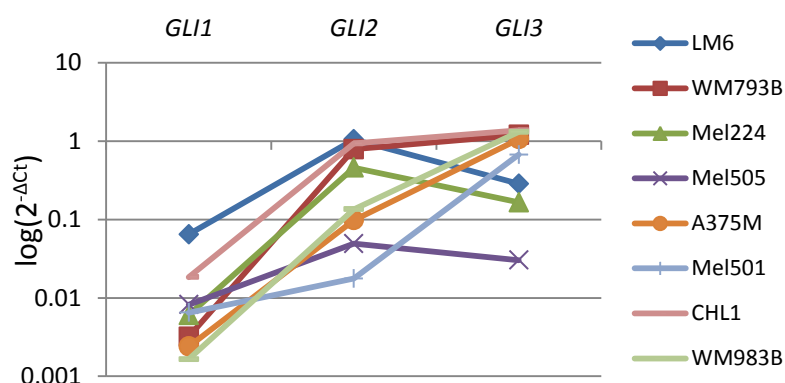
Rezultati testa Mann-Whitney U pokazuju da su geni *GLI1* i *GLI2* statistički značajno slabije eksprimirani u tumorskom tkivu (*GLI1*,  $p=0,0001$ ; *GLI2*,  $p<0,0001$ ), dok za gen *GLI3* ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji između tumorskog i zdravog tkiva. Nadalje, gen *GLI3* pokazuje najjaču ekspresiju ( $2^{-\Delta Ct} = 1$ ), nakon kojeg slijedi gen *GLI2* ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-2}$ - $10^{-1}$ ), pa gen *GLI1* s najslabijom ekspresijom ( $2^{-\Delta Ct} = 10^{-2}$ ) u tumorskom tkivu (slika 29).



**Slika 29: Relativna ekspresija gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u metastatskom melanomu čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu.** Ekspresiju gena analizirali smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali u logaritamskoj skali kao relativnu ekspresiju pojedinog gena normaliziranu prema ekspresiji referentnih gena *TBP* i *GUSB* ( $\log 2^{-\Delta C_t}$ ). Razliku u ekspresiji gena analizirali smo testom Mann-Whitney U. Navedene p-vrijednosti u crvenoj boji označavaju skupove podataka sa statistički značajnom razlikom u ekspresiji gena. Na slici su označene vrijednosti medijana (crvena točka) i interkvartilnog raspona. Analiza testom Mann-Whitney U pokazuje da su geni *GLI1* i *GLI2* statistički značajno slabije ekspimirani u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo tkivo.

#### 4.1.4.2. Ekspresija gena obitelji GLI u staničnim linijama melanoma čovjeka

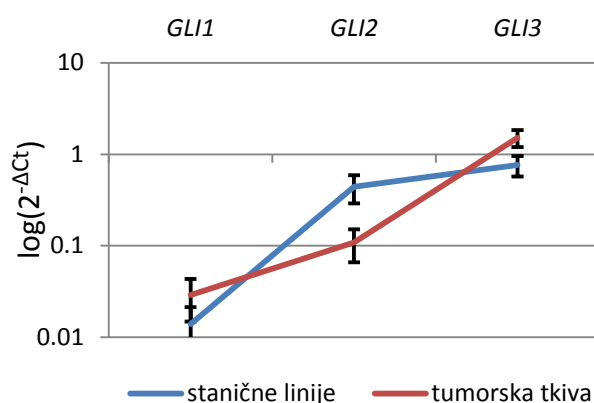
Rezultati qPCR-a pokazuju da su geni *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* ekspimirani u svih osam staničnih linija. U većini staničnih linija, gen *GLI3* pokazuje najjaču ekspresiju, nakon čega slijedi gen *GLI2*, pa *GLI1* (slika 30).



**Slika 30: Relativna ekspresija gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u staničnim linijama melanoma čovjeka.** Ekspresiju gena analizirali smo qPCR-om. Rezultate smo prikazali kao relativnu ekspresiju pojedinog gena normaliziranu prema ekspresiji referentnih gena *TBP* i *GUSB* ( $2^{-\Delta C_t}$ ). Rezultati pokazuju da je gen *GLI3* najjače ekspimiran, dok je gen *GLI1* ekspimiran najslabije.



Usporedivši srednje vrijednosti ekspresije gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u tumorskom tkivu s ekspresijom u staničnim linijama našli smo da stanične linije i tkiva metastatskog melanoma čovjeka imaju sličnu ekspresiju. Iz slike 31 vidi se da se ekspresija gena *GLI1* i *GLI3* u staničnim linijama i tumorskim tkivima gotovo podudara, dok gen *GLI2* ima višu ekspresiju u staničnim linijama u odnosu na tumorska tkiva.



**Slika 31: Usporedba srednjih vrijednosti relativne ekspresije gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* u tumorskim tkivima i staničnim linijama melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije gena analizirali smo qPCR-om. Rezultati pokazuju da je ekspresija gena *GLI1* i *GLI3* gotovo ista u staničnim linijama (plava linija) i tumorskom tkivu (crvena linija), dok je gen *GLI2* slabije ekspimiran u tumorskim tkivima u odnosu na stanične linije.

## 4.2. Korelacijska analiza ekspresije gena

Rezultati analize tumorskih tkiva pokazali su kako su izoforme gena *TP53* ( $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$ ), izoforme gena *TP73* (izoforme TAp73 i  $\Delta Np73$ ), te geni *GLI1* i *GLI2* statistički značajno slabije eksprimirani u tkivu metastatskog melanoma čovjeka u odnosu na zdravo tkivo.

Ct vrijednosti dobivene qPCR-om podvrgnuli smo korelacijskoj analizi. U tablici 22 navedeni su rezultati. Analiza je pokazala da nema korelacije između genske ekspresije izoformi *TP53* i genske ekspresije ostalih članova *TP73*, *NME* i *GLI*. Međutim, izoforme gena *TP53* pokazale su međusobno pozitivne korelacije. Tako je vrlo jaka pozitivna korelacija ( $\rho > 0,8$ ) nađena između izoformi  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$ , te  $\Delta 133p53\beta$  i  $\Delta 133p53\gamma$ , jaka pozitivna korelacija ( $0,6 < \rho < 0,8$ ) nađena je između izoformi p53 $\alpha$  i p53 $\beta$ ; p53 $\beta$  i p53 $\gamma$ ; p53 $\beta$  i  $\Delta 133p53\alpha$ ;  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 133p53\beta$ ;  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 133p53\gamma$ , dok je umjerena pozitivna korelacija ( $0,4 < \rho < 0,6$ ) nađena između izoformi p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$ ;  $\Delta 40p53\alpha$  i  $\Delta 40p53\beta$ .

S druge strane članovi obitelji *GLI* pokazali su pozitivnu korelaciju s članovima obitelji *NME* i izoformama *TP73*. Tako je gen *GLI2* pokazao umjerenu pozitivnu korelaciju s genom *NME2*, dok je slabu pozitivnu korelaciju pokazao s izoformama TAp73. Od ostalih korelacija valja istaknuti korelacije unutar pojedine obitelji gena. Tako je jaka pozitivna korelacija pokazana između gena *GLI1* i *GLI2*, umjerena pozitivna korelacija između gena *NME1* i *NME2*, dok je slaba pozitivna korelacija pokazana između izoformi TAp73 i  $\Delta Np73$ .

**Tablica 22: Tablica korelacijskih analiza genske ekspresije u tumorskim tkivima.** *P* označava statističku značajnost korelacije ( $P < 0,05$ ), dok  $\rho$  označava Spearmanov korelacijski koeficijent. Vrijednosti Spearmanova korelacijskog koeficijenta ( $\rho > 0,8$ ) označavaju vrlo jaku korelaciju (pozitivnu ili negativnu) između ekspresije dvaju gena; vrijednosti ( $0,6 < \rho < 0,8$ ) označavaju jaku korelaciju između ekspresije dva gena; vrijednosti ( $0,4 < \rho < 0,6$ ) označavaju umjerenu korelaciju između ekspresije dva gena, dok vrijednosti ( $0,3 < \rho < 0,4$ ) označavaju slabu korelaciju između ekspresije dva gena.

p53β	p53γ	Δ40p53α	Δ40p53β	Δ40p53γ	Δ133p53α	Δ133p53β	Δ133p53γ	TAp73	ΔNp73	NME1	NME2	GLI1	GLI2	GLI3		
0,70	0,47	-0,13	0,19	0,25	0,51	0,17	-0,01	-0,31	-0,04	0,06	0,02	-0,24	-0,29	-0,29	ρ p53α	
0,0004	0,037	0,591	0,435	0,298	0,074	0,573	0,966	0,188	0,880	0,816	0,950	0,310	0,215	0,217	P	
	0,62	-0,01	0,17	0,28	0,60	0,24	0,22	0,08	0,03	0,05	0,17	-0,10	-0,01	-0,34	ρ p53β	
	0,004	0,965	0,482	0,235	0,029	0,409	0,499	0,753	0,890	0,826	0,478	0,663	0,960	0,148	P	
		0,24	0,34	0,25	0,32	0,11	-0,10	-0,03	-0,12	0,02	-0,04	-0,24	-0,14	-0,34	ρ p53γ	
		0,333	0,154	0,300	0,308	0,721	0,770	0,892	0,627	0,932	0,864	0,333	0,581	0,159	P	
			0,57	0,27	-0,22	0,02	-0,13	0,11	-0,10	-0,11	0,07	0,12	0,08	-0,39	ρ Δ40p53α	
			0,009	0,248	0,499	0,943	0,709	0,663	0,694	0,642	0,781	0,617	0,737	0,103	P	
				0,85	-0,55	-0,15	-0,33	-0,14	-0,35	-0,03	-0,05	0,14	0,15	-0,28	ρ Δ40p53β	
				<0,0001	0,063	0,616	0,326	0,557	0,147	0,915	0,831	0,581	0,542	0,251	P	
						-0,56	0,13	-0,06	-0,06	-0,32	-0,04	0,06	0,25	0,09	ρ Δ40p53γ	
						0,059	0,668	0,873	0,814	0,188	0,875	0,814	0,304	0,307	0,716	P
							0,69	0,62	-0,10	0,16	-0,16	0,00	-0,35	-0,28	-0,16	ρ Δ133p53α
							0,005	0,024	0,723	0,559	0,559	1,000	0,196	0,321	0,576	P
								0,90	0,48	0,32	-0,28	0,12	-0,15	0,04	0,44	ρ Δ133p53β
								<0,0001	0,054	0,216	0,277	0,646	0,567	0,867	0,080	P
									0,27	0,14	-0,15	0,16	-0,40	-0,20	0,42	ρ Δ133p53γ
									0,328	0,630	0,603	0,576	0,144	0,475	0,121	P
										0,38	0,27	0,28	0,12	0,39	0,43	ρ TAp73
										0,031	0,132	0,127	0,520	0,030	0,013	P
											-0,07	0,16	0,04	0,01	0,39	ρ ΔNp73
											0,717	0,369	0,811	0,975	0,028	P
												0,58	-0,13	0,10	0,22	ρ NME1
												0,001	0,478	0,602	0,235	P
													0,13	0,44	0,26	ρ NME2
													0,483	0,012	0,149	P
														0,66	-0,09	ρ GLI1
														<0,0001	0,641	P
															0,12	ρ GLI2
															0,517	P

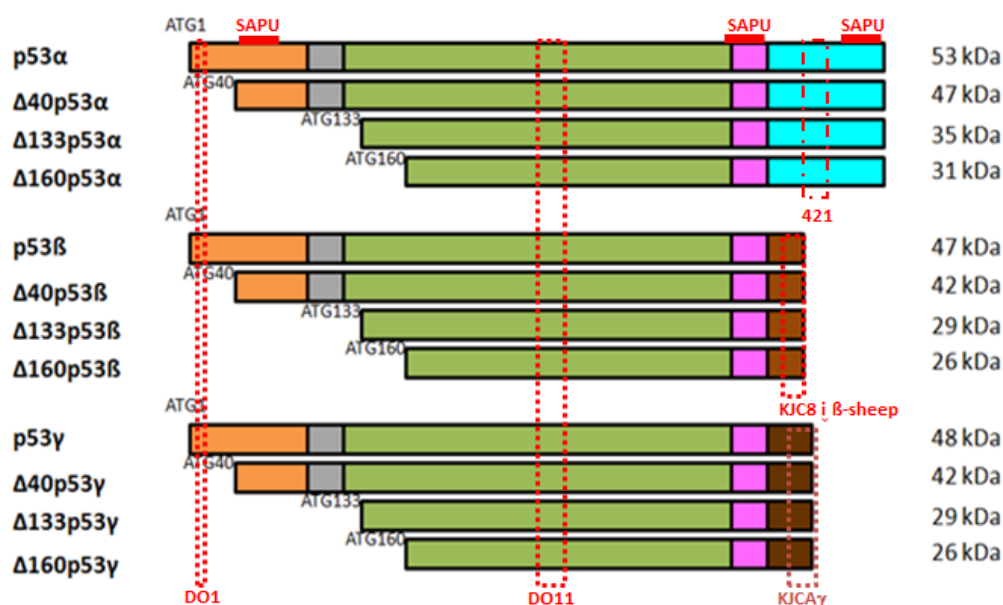
ρ - Spearman rank correlation coefficient

### 4.3. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI

Iz 30 parova tkiva metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva izolirali smo ukupne proteine koristeći metodu razbijanja stanica ultrazvukom u puferu za izolaciju proteina iz tkiva, dok smo ukupne proteine iz staničnih linija izolirali metodom razbijanja stanica ultrazvukom u PBS-u. Razliku u ekspresiji proteina između tumorskog i zdravog tkiva analizirali smo pomoću Wilcoxonovog testa za sparene uzorke.

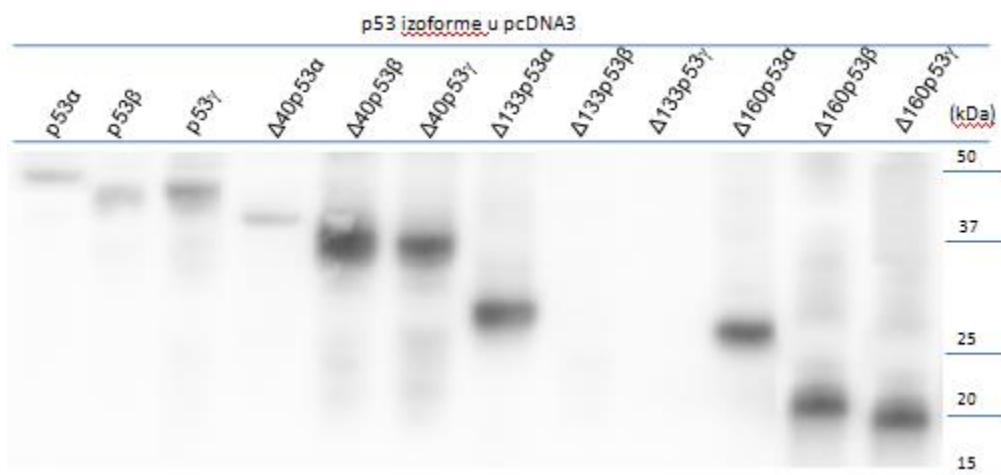
#### 4.3.1. Ekspresija proteina obitelji p53

Zbog složene građe gena *TP53*, protein p53 ima mnogobojne izoforme (detaljnije opisano u poglavlju 1.1.2 i 1.4.1). U tablici 20 (poglavlje 3.5.5.2) naveden je popis korištenih protutijela, kao i njihovi epitopi, dok su na slici 32 prikazane izoforme proteina p53 i mjesta vezanja specifičnih protutijela.



**Slika 32: Izoforme proteina p53 i mjesta vezanja specifičnih protutijela.** Protutijelo DO1 ima epitop u eksonu 2 (između 20. i 25. aminokiseline), te stoga prepoznaje izoforme s cjelovitim N krajem (p53α, p53β, p53γ). Protutijelo DO11 ima epitop na kraju eksona 5 i na početku eksona 6 (između 181. i 190. aminokiseline), te prepoznaje sve izoforme. Protutijelo SAPU ima nekoliko epitopa duž sekvence: u eksonima 2-3-4 (između 11. i 65. aminokiseline), u eksonima 8-9 (između 290. i 301. aminokiseline), te u eksonima 10-11 (između 363. i 393. aminokiseline). Protutijelo 421 ima epitop u eksonu 11 (između 372. i 379. aminokiseline), te prepoznaje izoforme alfa s cjelovitim C krajem (p53α, Δ40p53α, Δ133p53α, Δ160p53α). Protutijela KJC8 i β-sheep imaju epitop u alterantivnom eksonu 9β (između 332. i 341. aminokiseline), te prepoznaju izoforme beta (p53β, Δ40p53β, Δ133p53β, Δ160p53β). Protutijelo KJCAγ ima epitop u alternativnom eksonu 9γ (između 332. i 346. aminokiseline), te prepoznaje izoforme gama (p53γ, Δ40p53γ, Δ133p53γ, Δ160p53γ).

Da bi odredili položaj pojedine izoforme proteina p53 na poliakrilamidni gel (SDS-PAGE) nanijeli smo standarde, odnosno uzorke proteina stanica transficiranih određenom izoformom proteina p53, te proveli analizu Western blot koristeći protutijelo protu-p53 (DO11). Na slici 33 prikazan je položaj izoformi na nitorceluloznoj membrani. Ekspresijski vektori koji sadrže  $\Delta 133p53\beta$  i  $\Delta 133p53\gamma$  nisu ekspimirali željene proteine, te ćemo te izoforme detektirati prema boju aminokiselina. Naime oni putuju kao proteini od 29 kDa.



**Slika 33: Položaj izoformi proteina p53 na SDS-PAGE-u.** Staničnu liniju H1299, koja ne ekspirira protein p53, prolazno smo transficirali plazmidima p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 40p53\beta$ ,  $\Delta 40p53\gamma$ ,  $\Delta 133p53\alpha$ ,  $\Delta 133p53\beta$ ,  $\Delta 133p53\gamma$ ,  $\Delta 160p53\alpha$ ,  $\Delta 160p53\beta$  i  $\Delta 160p53\gamma$ . Dvadeset i četiti sata kasnije iz stanica smo izolirali proteine i nanijeli ih na 10% poliakrilamidni gel. Rezultati pokazuju da su pojedine izoforme proteina p53 vrlo blizu jedna drugoj te ih je stoga vrlo teško razlikovati protutijelima koja prepoznaju sve izoforme odjednom. Međutim, koristeći specifična protutijela za pojedini skup izoformi moguće ih je bolje razlikovati.

Izoforme alfa proteina p53 (p53 $\alpha$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$ ) međusobno se razlikuju u tome što im nedostaje određeni broj aminokiselina na N kraju. Tako protein p53 $\alpha$  (FL, kanonski p53) sadrži 393 aminokiseline, dok izoforme  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$  sadrže 354, 261 i 234 aminokiseline (nedostaje im prvih 39, 132 ili 159 aminokiselina). Zbog različitog broja aminokiselina, njihova masa je različita te stoga različito putuju na poliakrilamidnom gelu. Vrpce na poliakrilamidnom gelu za p53 $\alpha$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$  nalaze se na 49, 42, 35 i 29 kDa, te ih je, koristeći protutijelo koje specifično prepoznaje alfa izoforme, protu-p53 (421) lako međusobno razlikovati.

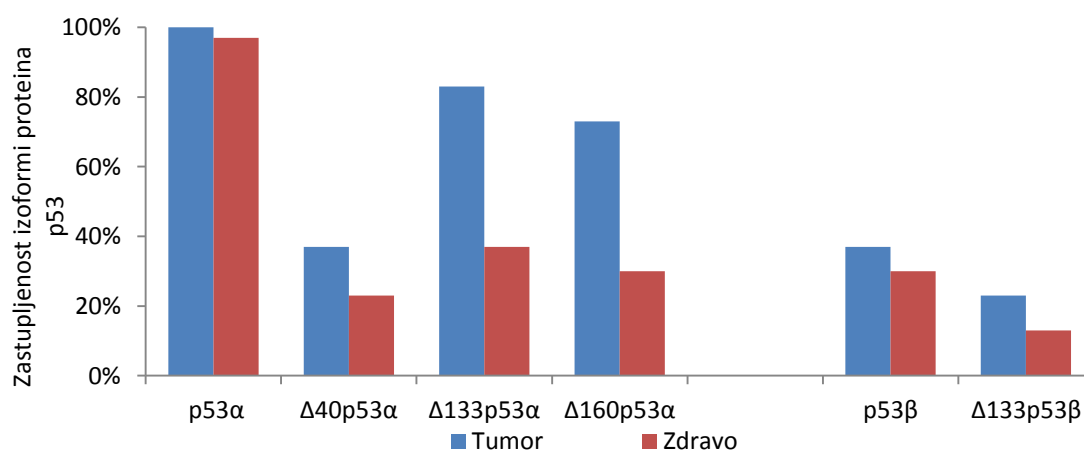
Izoforme beta (p53 $\beta$ ,  $\Delta 40p53\beta$ ,  $\Delta 133p53\beta$  i  $\Delta 160p53\beta$ ) međusobno se razlikuju na N kraju isto kao i alfe, te sadrže redom 341, 302, 209 i 182 aminokiseline i vrpce na poliakrilamidnom gelu nalaze se na 45, 35, 25 i 21 kDa. Koristeći protutijelo koje specifično prepoznaje beta izoforme, protu-p53 $\beta$  (KJC8 i  $\beta$ -sheep) lako se razlikuju.

Izoforme gama ( $p53\gamma$ ,  $\Delta40p53\gamma$ ,  $\Delta133p53\gamma$  i  $\Delta160p53\gamma$ ) građene su od 346, 307, 214 i 187 aminokiselina i vrpce na poliakrilamidnom gelu nalaze se na 47, 35, 25 i 20 kDa, te ih je, koristeći protutijelo koje specifično prepoznaje gama izoforme, protu- $p53\gamma$  (KJCA $\gamma$ ) lako razlikovati.

#### 4.3.1.1. Ekspresija proteina obitelji p53 u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu

Za određivanje ekspresije izoformi proteina p53 koristili smo metode SDS-PAGE i Western blot. Specifičnim protutijelima (protu-p53 421 za izoforme alfa, te protu-p53 KJC8 za izoforme beta) odredili smo prisutnost pojedinih izoformi. Protutijelima koja prepoznaju sve izoforme proteina p53 (protu-p53 SAPU ili DO11) pokušali smo utvrditi postojanje gama izoformi jer tijekom izrade ovog dijela nismo posjedovali protutijelo specifično za gama izoforme. Protutijelo protu- $\beta$ -aktin koristili smo kao kontrolu nanošenja uzoraka. Rezultati prikazani u ovom poglavlju rezultati su Bastiena Prousta, studenta koji je pod mentorstvom dr. sc. Nede Slade i pod mojim neposrednim voditeljstvom izradio svoj diplomski rad 2016. godine.

Rezultati analize Western blot pokazali su da sva tkiva eksprimiraju neke od izoformi proteina p53. Na slici 34 prikazana je njihova zastupljenost u tumorskim i kontrolnim tkivima.



**Slika 34: Zastupljenost izoformi proteina p53 u tumorskim i kontrolnim zdravim tkivima.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifična protutijela protu-p53 421 za alfa izoforme,  $\beta$ sheep za beta izoforme, te SAPU za sve izoforme. Kao kontrolu nanošenja uzoraka koristili smo protutijelo protu- $\beta$ -aktin. Rezultati pokazuju da sva tkiva eksprimiraju neke od izoformi proteina p53. Najzastupljenija izoforma je p53 $\alpha$ , nakon čega slijede  $\Delta133\alpha$ ,  $\Delta160\alpha$ , p53 $\beta$ , te  $\Delta40\alpha$ . Najmanje eksprimirana izoforma je  $\Delta133\beta$ . Izoforma  $\Delta40\beta$  kao i gama izoforme nisu detektirane niti u tumorima niti u zdravom tkivu. Sve izoforme pokazuju višu zastupljenost u tumorskim tkivima.

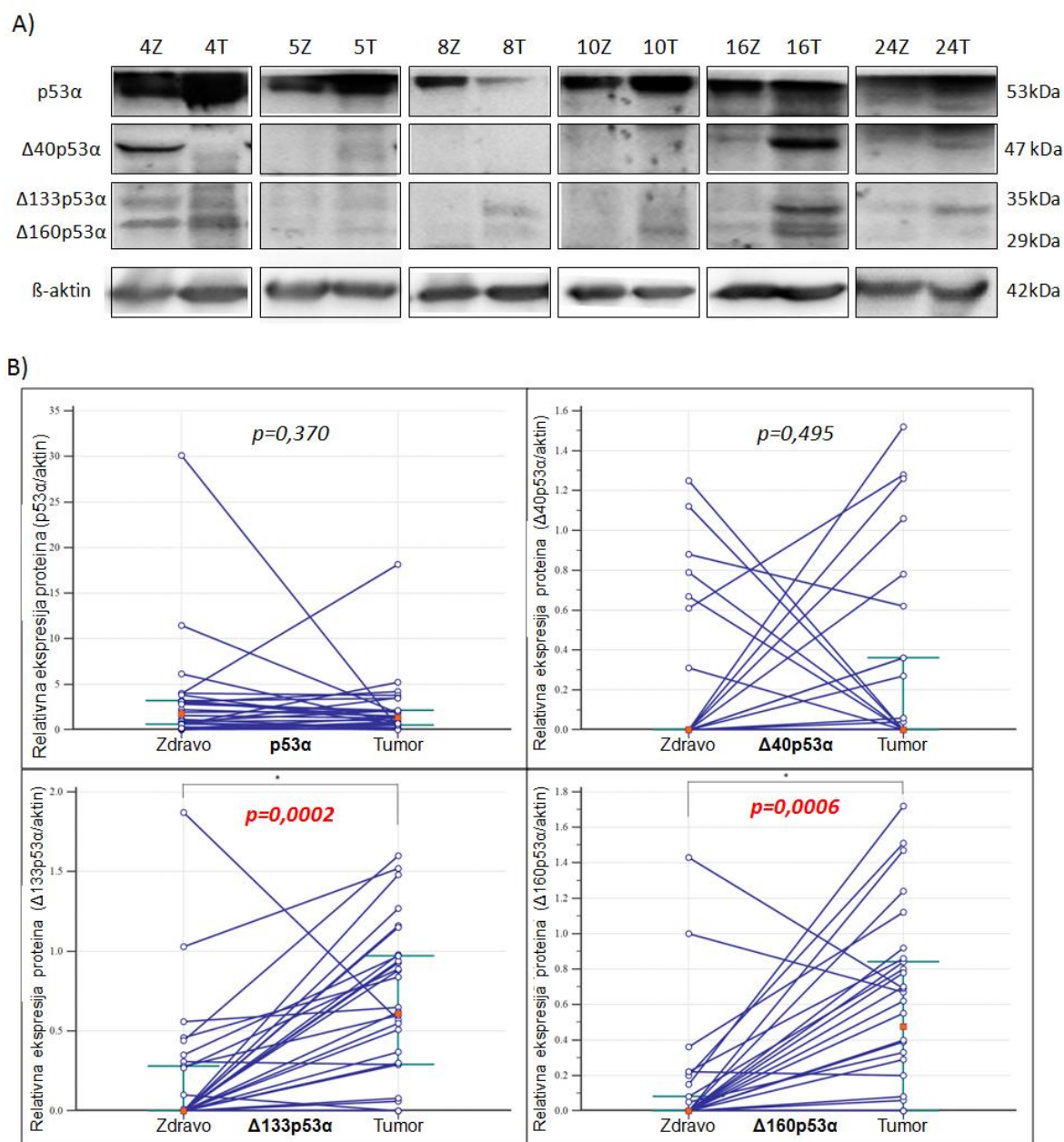
Analiza izoformi p53 pokazuje najvišu zastupljenost izoforme p53 $\alpha$ , nakon čega redom slijede  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 160p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\beta$ .

Izoforma p53 $\alpha$  zastupljena je u svih 30 (100%) tumorskih i 29 (97%) kontrolnih zdravih tkiva, dok su izoforme  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 160p53 $\alpha$  zastupljene u 25 (83%) tumorskih i 11 (37%) kontrolnih zdravih tkiva, odnosno u 22 (73%) tumorskih i 9 (30%) kontrolnih zdravih tkiva. Izoforma p53 $\beta$  zastupljena je u 11 (37%) tumorskih i 9 (30%) kontrolnih zdravih tkiva, dok je izoforma  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  zastupljena u 11 (37%) tumorskih i 7 (23%) kontrolnih zdravih tkiva. Izoforma  $\Delta$ 133p53 $\beta$  pokazuje najmanju zastupljenost. Ona je eksprimirana svega u 7 (23%) tumorskih i 4 (13%) kontrolnih zdravih tkiva dok izoforme  $\Delta$ 40p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$  i  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  nisu eksprimirane niti u tumorskim niti u zdravim tkivima. Općenito, izoforme proteina p53 pokazuju višu zastupljenost u tumorskim tkivima (slika 34).

Uspoređujući ekspresiju izoforme alfa u parovima tumorskih i zdravih tkiva, analiza metodom Western blot pokazuje najjaču ekspresiju izoforme p53 $\alpha$  normaliziranu  $\beta$ -aktinom (p53 $\alpha$ / $\beta$ -aktin = 2), dok je ekspresija izoforme  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  najniža ( $\Delta$ 40p53 $\alpha$ / $\beta$ -aktin = 0,25). Obje izoforme podjednako su eksprimirane u tumorskim i u zdravim tkivima. U većini parova tumorskog i zdravog tkiva, izoforme  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 160p53 $\alpha$  su statistički značajno jače eksprimirane u tumorskim tkivima, nego u zdravim uzorcima ( $p=0,0002$  i  $p=0,0006$ ) (slika 35).

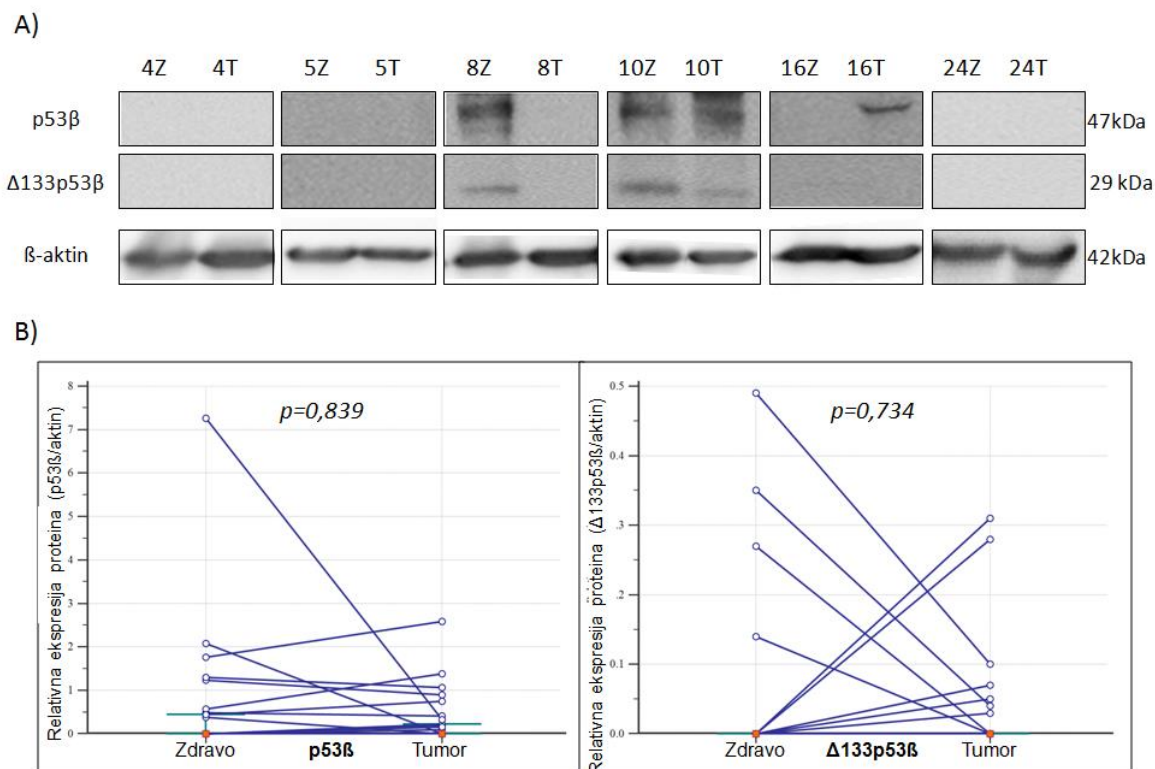
Nadalje, gledajući izoforme beta u parovima tumorskih i zdravih tkiva, Western blot analiza pokazuje najjaču ekspresiju izoforme p53 $\beta$  (relativna ekspresija p53 $\beta$ / $\beta$ -aktin = 0,27), dok izoforme  $\Delta$ 40p53 $\beta$  i  $\Delta$ 160p53 $\beta$  nisu detektirane. Beta izoforme podjednako su eksprimirane kako u tumorskim tako i u zdravim tkivima (slika 36).

Gama izoforme (p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  i  $\Delta$ 160p53 $\gamma$ ) nismo bili u mogućnosti detektirati tada raspoloživim protutijelima i metodama niti u jednom paru metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva.



**Slika 35: Ekspresija izoformi alfa proteina p53 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-p53 $\alpha$  421, te protutijelo protu- $\beta$ -aktin (A). Densitometrijom smo odredili razinu ekspresije te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju proteina normaliziranu ekspresijom  $\beta$ -aktina. Razliku u ekspresiji proteina analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina ( $p < 0,05$ ) označili smo crvenom bojom (B). Rezultati pokazuju da su izoforme  $\Delta 133\alpha$  i  $\Delta 160\alpha$  statistički značajno jače ekspimirane u tumorskom tkivu.



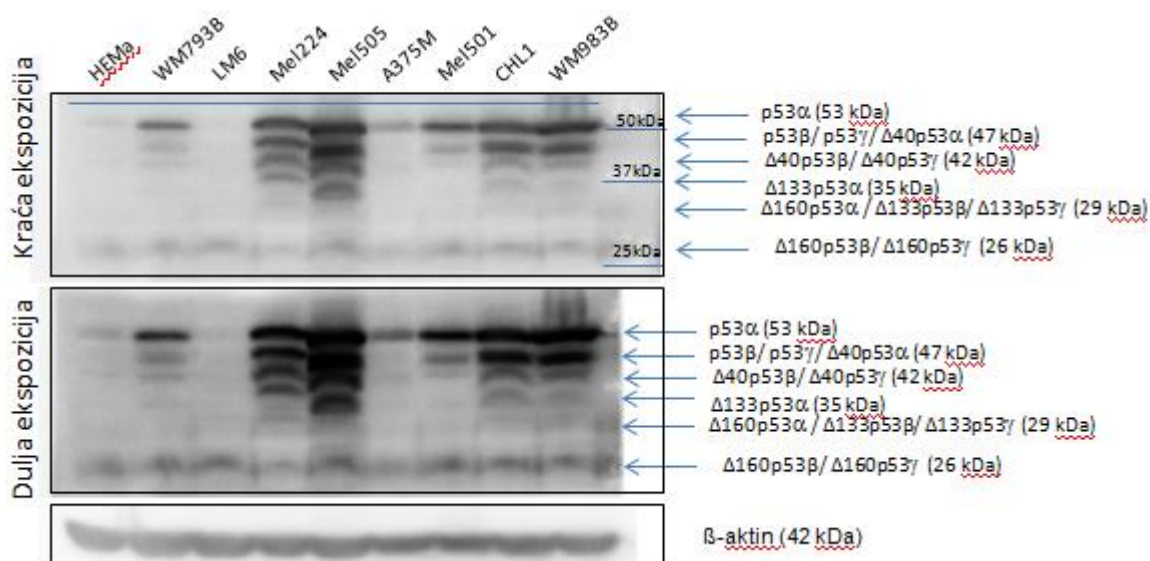


**Slika 36: Ekspresija izoformi beta proteina p53 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i njegovog pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-p53 $\beta$   $\beta$ sheep, te protutijelo protu- $\beta$ -aktin (A). Denzitometrijom smo odredili razinu ekspresije te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju proteina normaliziranu ekspresijom  $\beta$ -aktina. Razliku u ekspresiji proteina analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke (B). Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji izoformi p53 beta između tumorskih i zdravih tkiva.

#### 4.3.1.2. Ekspresija proteina obitelji p53 u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima

Rezultati analize SDS-PAGE i Western blot pokazuju da izoforme proteina p53 nisu eksprimirane u svim staničnim linijama. Tako stanična linija LM6 ne eksprimira nijednu izoformu proteina p53 što je u skladu s rezultatima genske ekspresije.

Nadalje, stanične linije s mutiranim genom *TP53* (Mel224, Mel505, CHL1 i WM983B) pokazuju jaču ekspresiju izoformi proteina p53 od staničnih linija s divljim tipom *TP53* (WM793B, A375M i Mel501). Uz to, one eksprimiraju više različitih izoformi. Kontrolna stanična linija melanocita HEMa slabo eksprimira izoforme proteina p53 (slika 37).



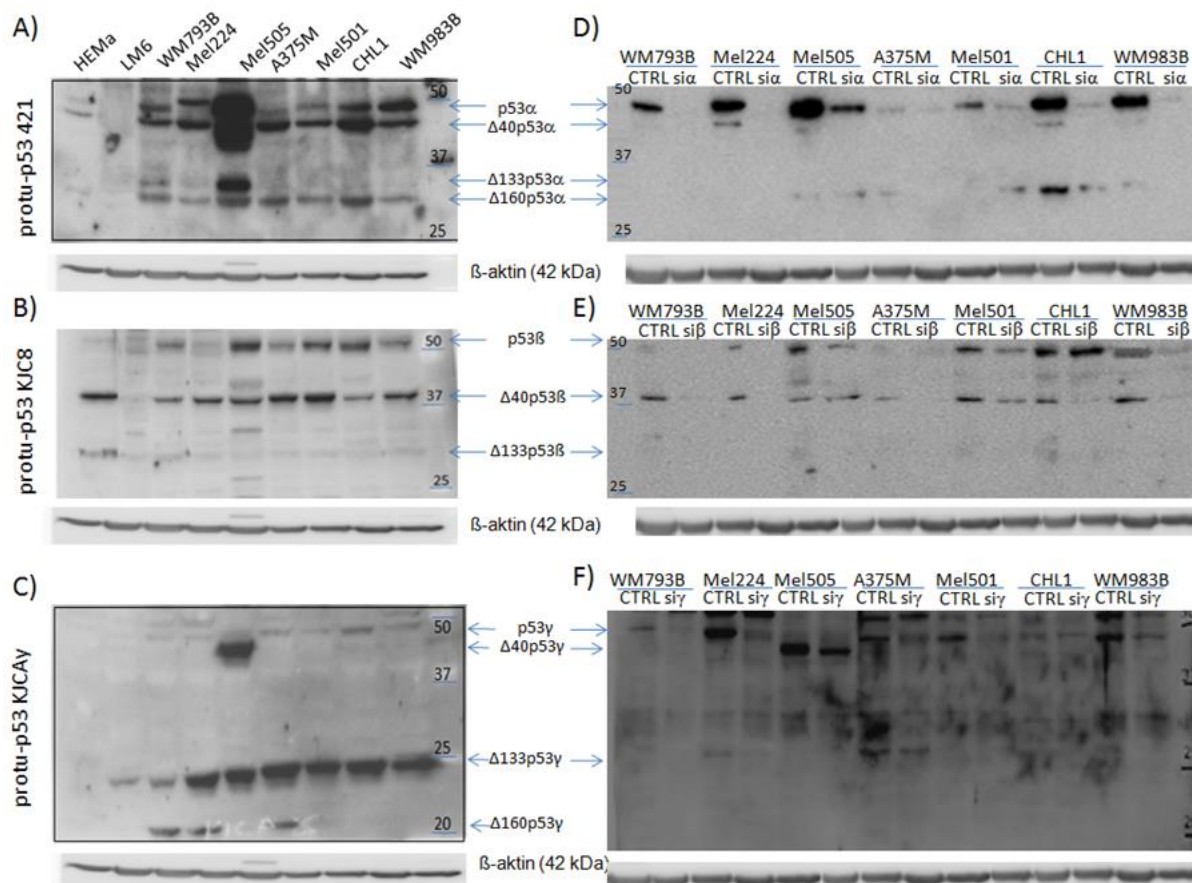
**Slika 37: Ekspresija izoformi proteina p53 u staničnim linijama metastatskog melanoma čovjeka i kontrolnoj staničnoj liniji melanocita.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-p53 (SAPU) koje prepoznaje sve izoforme proteina p53, te protutijelo protu-β-aktin. Rezultati pokazuju da je ekspresija izoformi p53 jača u staničnim linijama s mutiranim *TP53* (Mel1224, Mel1505, CHL1 i WM983B) nego u staničnim linijama s divljim tipom gena *TP53* (WM793B, A375M i Mel1501).

S obzirom da protutijelo protu-p53 SAPU prepoznaje sve izoforme, kako bi bili sigurni u prisutnost pojedinih izoformi koristili smo specifična protutijela protu-p53: 421 za izoforme alfa, KJC8 za izoforme beta i KJCA $\gamma$  za izoforme gama (slika 38 A, B, C). Kao dodatnu potvrdu prisutnosti pojedinih izoformi proteina p53, stanične linije utišavali smo malim interferirajućim molekulama RNA (slika 38 D, E, F).

Rezultati SDS-PAGE i Western blot sa specifičnim protutijelima potvrđuju da stanične linije s mutiranim genom *TP53* imaju jaču ekspresiju izoformi alfa (slika 38 A) za razliku od staničnih linija s divljim tipom gena *TP53*. Rezultati utišavanja dodatno potvrđuju pojačanu ekspresiju izoformi alfa u staničnim linijama s mutiranim genom *TP53* (Slika 38 D).

Izoforme beta i gama su nejednoliko raspoređene u staničnim linijama (slika 38 B i C). Rezultati utišavanja potvrđuju njihovu nejednoliku ekspresiju (slika 38 E i F).

Nadalje, od alfa izoformi proteina p53 najjače su eksprimirane p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , te  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  (Slika 38 A). Od izoformi beta najjače je eksprimirana  $\Delta$ 40p53 $\beta$  (Slika 38 B), dok je od gama izoformi najjače eksprimirana  $\Delta$ 133p53 $\gamma$  (Slika 38 C). Ekspresija izoformi proteina p53 u staničnim linijama melanoma čovjeka prikazana je u tablici 23.

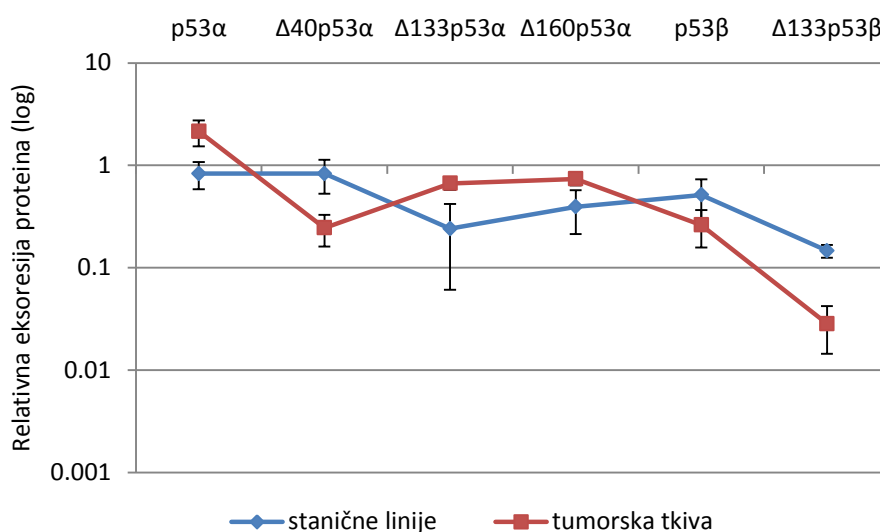


**Slika 38: Određivanje ekspresije izoformi proteina p53 u staničnim linijama melanoma čovjeka i melanocita korištenjem specifičnih protutijela i malih interferirajućih molekula RNA (siRNA).** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifična protutijela protu-p53: 421 za izoforme alfa (A), KJC8 za izoforme beta (B) i KJCA $\gamma$  za izoforme gama (C). Utišavanjem pojedinog skupa izoformi sa specifičnim siRNA – sia (D), si $\beta$  (E) i si $\gamma$  (F) dodatno smo potvrdili prisutnost izoformi p53 u stanicama. Protutijelo protu-  $\beta$ -aktin koristili smo kao kontrolu nanošenja. Rezultati pokazuju pojačanu ekspresiju izoformi alfa u staničnim linijama s mutiranim *TP53* (Mel224, Mel505, CHL1, WM983B). Izoforme beta i gama su vrlo nejednoliko raspoređene u staničnim linijama. Općenito najjače ekspimirane izoforme u staničnim linijama su p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$  i  $\Delta$ 133p53 $\gamma$ .

**Tablica 23: Ekspresija izoformi proteina p53 u staničnim linijama.**

	HEMa	LM6	WM793B	Mel224	Mel505	A375M	Mel501	CHL1	WM793B
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 $\gamma$			++	++		++			

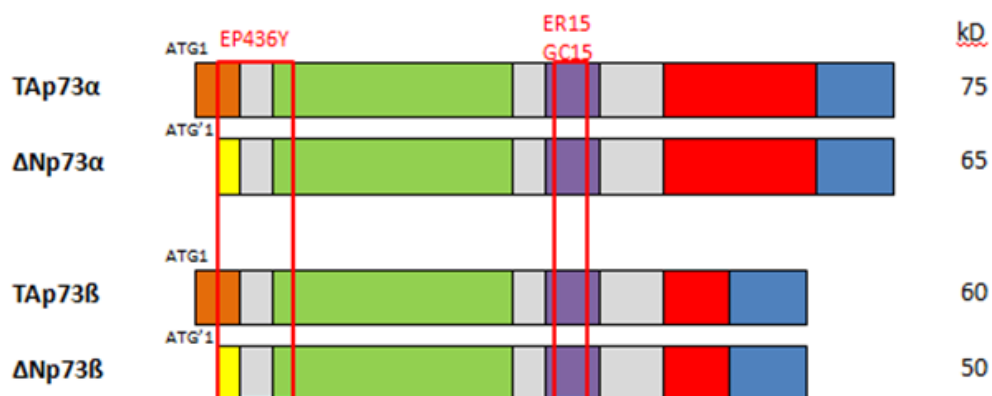
Nadalje, usporedili smo ekspresiju izoformi proteina p53 u tumorskom tkivu i u staničnim linijama - srednju vrijednost ekspresije pojedine izoforme u tumorskim tkivima usporedili smo sa srednjom vrijednosti ekspresije pojedine izoforme u staničnim linijama melanoma. Ustanovili smo da se ekspresija proteina u staničnim linijama i tkivima metastatskog melanoma čovjeka razlikuje. Naime, izoforme p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 160p53 $\alpha$  pokazuju jaču ekspresiju u tumorskim tkivima u odnosu na stanične linije, dok ostale izoforme ( $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ) pokazuju jaču ekspresiju u staničnim linijama (slika 39).



**Slika 39: Usporedba srednjih vrijednosti relativne ekspresije izoformi p53 svih tumorskih tkiva i svih staničnih linija melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifična protutijela protu-p53: 421 za izoforme alfa i  $\beta$ sheep/KJC8 za izoforme beta. Rezultati pokazuju da su izoforme p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 160p53 $\alpha$  eksprimirane jače u tumorskim tkivima (crvena linija) za razliku od staničnih linija (plava linija). Ostale izoforme ( $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ) su eksprimirane jače kod staničnih linija.

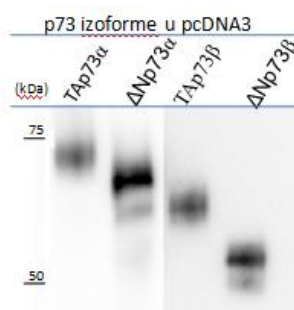
### 4.3.2. Ekspresija proteina obitelji p73

Zbog složene građe gena *TP73*, protein p73 ima mnogobojne izoforme (detaljnije objašnjeno u poglavlju 1.1.2 i 1.4.2). U tablici 20 (poglavlje 3.5.5.2) naveden je popis korištenih protutijela, kao i njihovi epitopi, dok su na slici 40 prikazane izoforme proteina p73 koje smo proučavali i mjesta vezanja specifičnih protutijela.



**Slika 40: Izoforme proteina p73 i mjesta vezanja specifičnih protutijela.** Protutijela ER15 i GC15 imaju epitop na kraju eksona 9 i na početku eksona 10 (između 367. i 380. aminokiseline), a protutijelo EP436Y ima epitop u eksonu 3 i eksonu 4 (između 50. i 150. aminokiseline), te oni kao takvi prepoznaju sve izoforme od interesa (TAp73α, ΔNp73α, TAp73β, ΔNp73β).

Da bi odredili položaj pojedine izoforme proteina p73 na poliakrilamidni gel (SDS-PAGE) smo nanijeli standarde, odnosno uzorke proteina stanica transficiranih određenom izoformom proteina p73, te proveli analizu Western blot koristeći protutijelo protu-p73 (EP436Y). Izoforme proteina p73 različito putuju u poliakrilamidnom gelu te ih je, koristeći specifična protutijela za p73, vrlo lako razlikovati (slika 41).



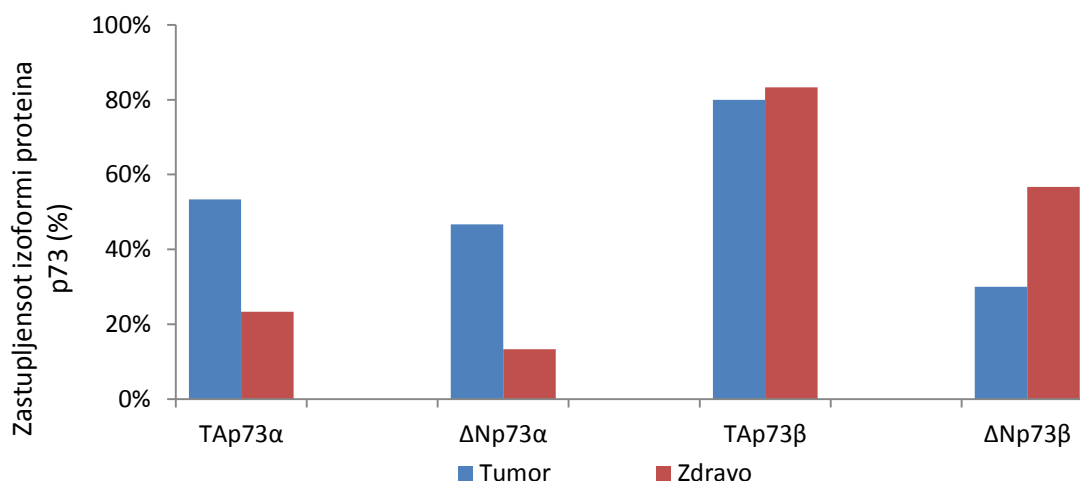
**Slika 41: Položaj izoformi proteina p73 na SDS-PAGE-u.** Staničnu liniju H1299 prolazno smo transficirali plazmidima TAp73α, ΔNp73α, TAp73β, ΔNp73β. Dvadeset i četiti sata kasnije iz stanica smo izolirali proteine i nanijeli ih na 7% poliakrilamidni gel. Pojedine izoforme proteina p73 različito putuju u poliakrilamidnom gelu, te ih, koristeći specifična protutijela za p73 vrlo lako možemo razlikovati.

Izoforme alfa proteina p73, TAp73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , razlikuju se u prve 62 aminokiseline na N kraju. Tako protein TAp73 $\alpha$  sadrži 636 aminokiselina, dok izoforma  $\Delta$ Np73 $\alpha$  sadrži 575 aminokiselina (nedostaju joj prve 62 aminokiseline). Beta izoforme proteina p73, TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$ , isto kao i alfe, razlikuju se u prve 62 aminokiseline na N kraju. Tako protein TAp73 $\beta$  sadrži 499 aminokiselina, dok izoforma  $\Delta$ Np73 $\beta$  sadrži 438 aminokiselina. Zbog različitog broja aminokiselina, njihova masa je različita te stoga različito putuju na poliakrilamidnom gelu. Vrpce na poliakrilamidnom gelu za TAp73 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  nalaze se na 70, 65, 60 i 50 kDa, te ih je vrlo lako razlikovati koristeći protu-p73 protutijela.

#### 4.3.2.1. Ekspresija proteina obitelji p73 u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu

Za određivanje ekspresije izoformi proteina p73 koristili smo metode SDS-PAGE i Western blot. Protutijelom specifičnim za sve izoforme (EP436Y) odredili smo ekspresiju izoformi TAp73 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$ . Protutijelo protu- $\beta$ -aktin služio je kao kontrola nanošenja uzoraka.

Rezultati analize Western blot pokazali su da sva tkiva ekspimiraju neke od izoformi proteina p73. Na slici 42 prikazana je njihova zastupljenost u tumorskim i kontrolnim tkivima.



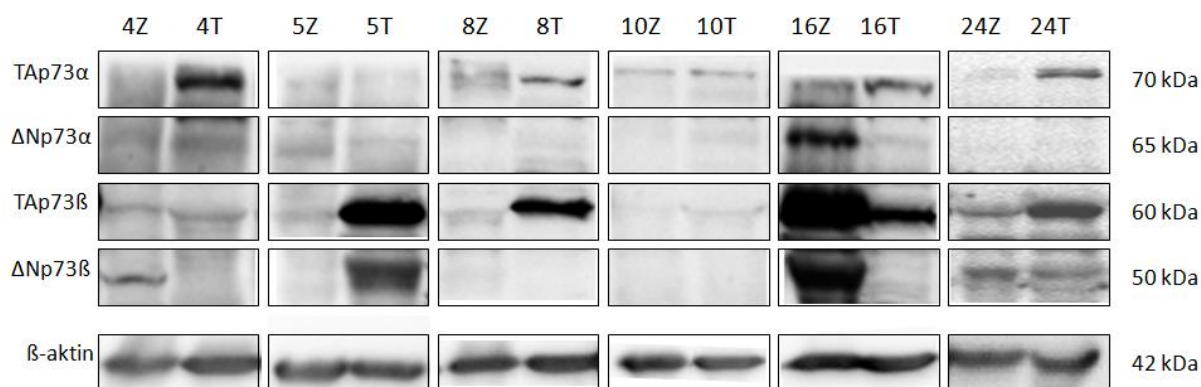
**Slika 42: Zastupljenost izoformi proteina p73 u tumorskim i kontrolnim zdravim tkivima.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-p73 (EP436Y) koje prepoznaje sve izoforme proteina p73. Kao kontrolu nanošenja uzoraka koristili smo protutijelo protu- $\beta$ -aktin. Rezultati pokazuju da sva tkiva ekspimiraju neke od izoformi proteina p73. Najzastupljenija izoforma je TAp73 $\beta$ , nakon čega slijede ostale izoforme s podjednakom zastupljenošću. Izoforme alfa su zastupljenije u tumorskim tkivima, dok su izoforme beta zastupljenije u zdravim tkivima.

Analiza izoformi p73 pokazuje najvišu zastupljenost izoforme TAp73 $\beta$ , nakon čega redom slijede  $\Delta$ Np73 $\beta$ , TAp73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ .

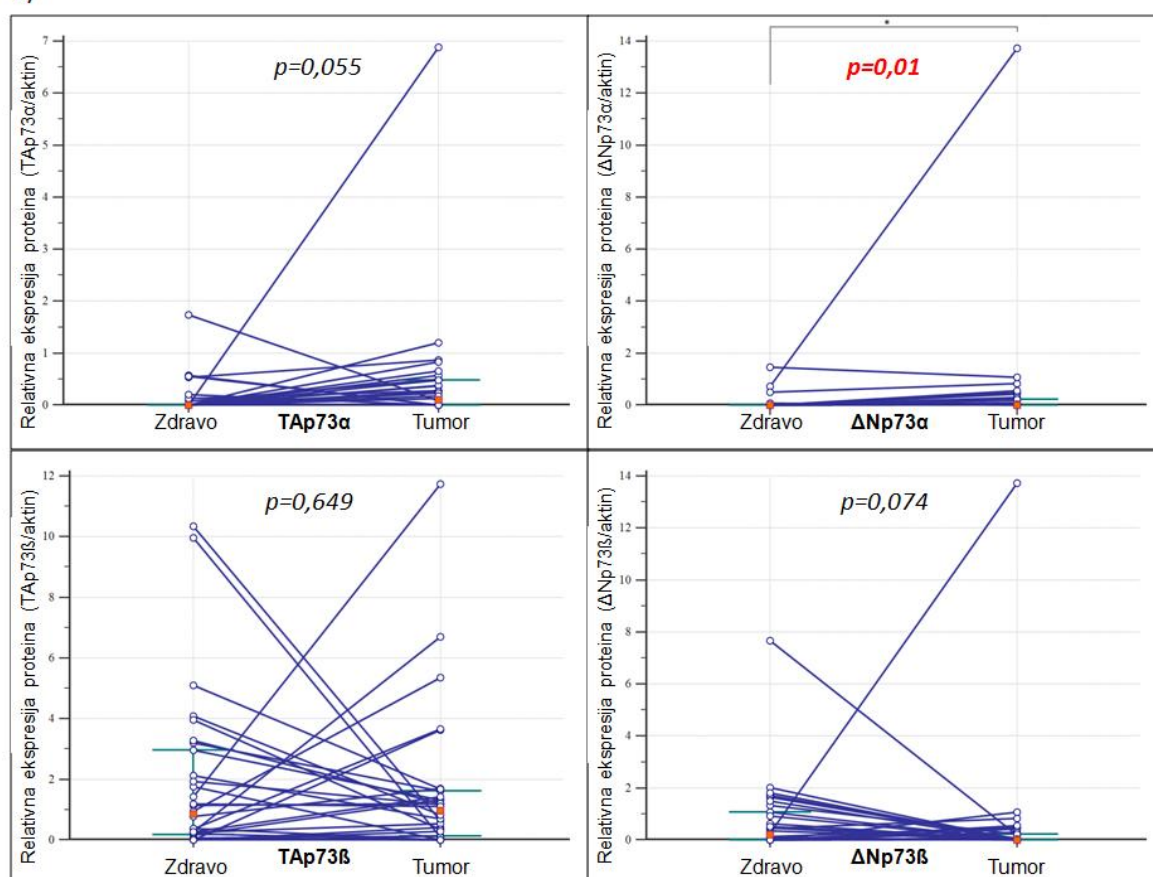
Izoforma TAp73 $\beta$  zastupljena je u 24 (80%) tumorskih i 25 (83%) kontrolnih zdravih tkiva, dok su izoforme  $\Delta$ Np73 $\beta$  i TAp73 $\alpha$  zastupljene u 9 (30%) tumorskih i 17 (57%) kontrolnih zdravih tkiva, odnosno u 16 (53%) tumorskih i 7 (23%) kontrolnih zdravih tkiva. Izoforma  $\Delta$ Np73 $\alpha$  pokazuje najmanju zastupljenost. Ona je eksprimirana u svega 14 (47%) tumorskih i 4 (13%) kontrolnih zdravih tkiva. Općenito, izoforme alfa su više zastupljene u tumorskim tkivima, dok su izoforme beta više zastupljene u zdravim tkivima. (slika 42).

Uspoređujući ekspresiju izoformi proteina p73 u parovima tumorskih i zdravih tkiva, analiza SDS-PAGE i Western blot pokazuje da su izoforme vrlo raznoliko eksprimirane. U većini parova tumorskog i zdravog tkiva izoforma  $\Delta$ Np73 $\alpha$  statistički je značajno jače eksprimirana u tumorskim tkivima ( $p=0,01$ ). Ostale izoforme nisu pokazale statistički značajnu razliku u ekspresiji između tumorskog i zdravog tkiva. Najjače eksprimirana izoforma je TAp73 $\beta$  (TAp73 $\beta$ / $\beta$ -aktin = 1,62), dok najslabiju ekspresiju pokazuje  $\Delta$ Np73 $\beta$  ( $\Delta$ Np73 $\beta$ / $\beta$ -aktin = 0,16) (slika 43).

A)



B)



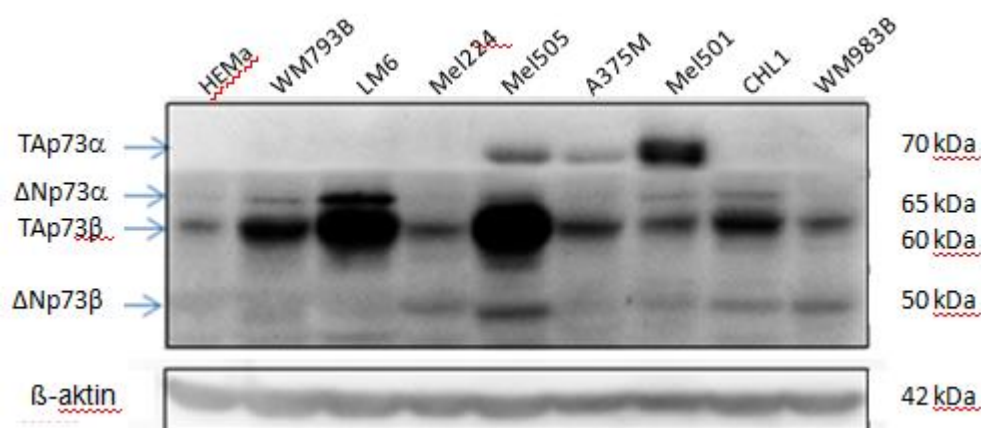
**Slika 43: Ekspresija izoformi proteina p73 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-p73 (EP436Y), te protutijelo protu-β-aktin (A). Densitometrijom smo odredili razinu ekspresije te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju proteina normaliziranu ekspresijom β-aktina. Razliku u ekspresiji proteina analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina ( $p<0,05$ ) označene su crvenom bojom (B). Rezultati pokazuju da je izoforma ΔNp73α statistički značajno jače ekspimirana u tumorskom tkivu.



#### 4.3.2.2. Ekspresija proteina obitelji p73 u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima

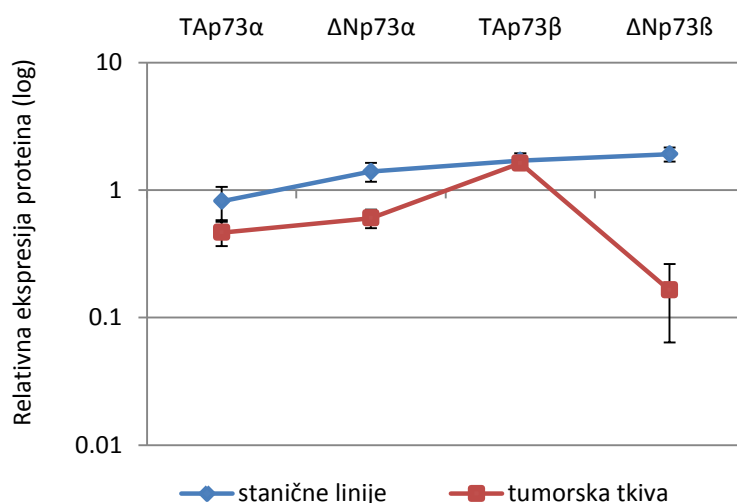
Rezultati analize SDS-PAGE i Western blot pokazuju da su izoforme proteina p73 ekspimirane u svim ispitivanim staničnim linijama.

Kao i u analizi ekspresije izoformi p73 u tkivima, analiza na staničnim linijama pokazuje najvišu zastupljenost izoforme TAp73 $\beta$ , nakon čega redom slijede  $\Delta$ Np73 $\beta$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$ . Izoforma TAp73 $\beta$  ekspimirana je u svim staničnim linijama, dok su ostale izoforme ekspimirane samo u nekim staničnim linijama. Izoforme  $\Delta$ Np73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ekspimirane su u pet staničnih linija, dok je izoforma TAp73 $\alpha$  ekspimirana u tri stanične linije. Kontrolna stanična linija melanocita HEMa slabo ekspimirira izoforme proteina p73, a detektirali smo samo  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  izoforme (slika 44).



**Slika 44: Ekspresija izoformi proteina p73 u staničnim linijama metastatskog melanoma čovjeka i u kontrolnoj staničnoj liniji melanocita.** Ekspresija proteina analizirana je metodom SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-p73 (EP436Y) koje prepoznaje sve izoforme proteina p73, te protutijelo protu-  $\beta$ -aktin. Sve stanične linije ekspimiraju neke od izoformi p73.

Nadalje, usporedbom ekspresije izoformi proteina p73 u tumorskom tkivu i staničnim linijama (srednju vrijednost ekspresije pojedine izoforme u tumorskim tkivima usporedili smo sa srednjom vrijednošću ekspresije pojedine izoforme u staničnim linijama melanoma) našli smo da je ekspresija proteina u staničnim linijama i tkivima metastatskog melanoma čovjeka gotovo podudarna, a značajnije odstupanje pokazuje jedino izoforma  $\Delta$ Np73 $\beta$  (slika 45).



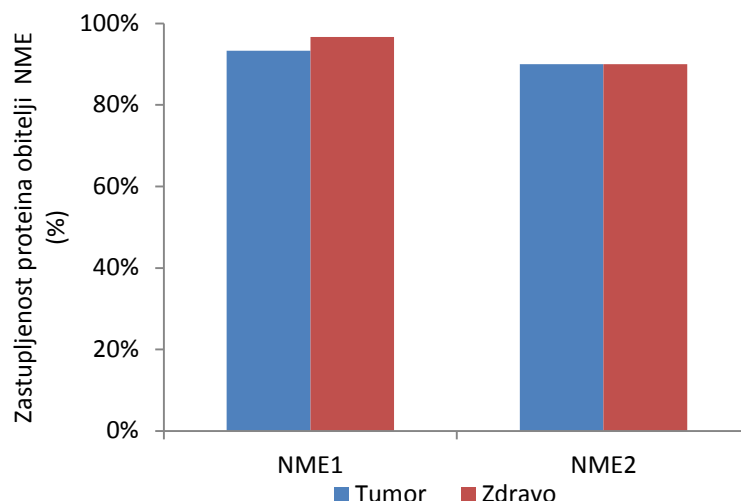
**Slika 45: Usporedba srednjih vrijednosti relativne ekspresije izoformi p73 svih tumorskih tkiva i svih staničnih linija melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijelo protu-p73 (EP436Y). Rezultati pokazuju da je ekspresija proteina u staničnim linijama (plava linija) i tkivima metastatskog melanoma čovjeka (crvena linija) gotovo podudarna. Značajnije odstupanje pokazuje jedino izoforma ΔNp73β.

### 4.3.3. Ekspresija proteina obitelji NME

Za određivanje ekspresije proteina obitelji NME koristili samo metode SDS-PAGE i Western blot te specifičnim protutijelima odredili ekspresiju NME1 i NME2 u tkivima i staničnim linijama metastatskog melanoma čovjeka.

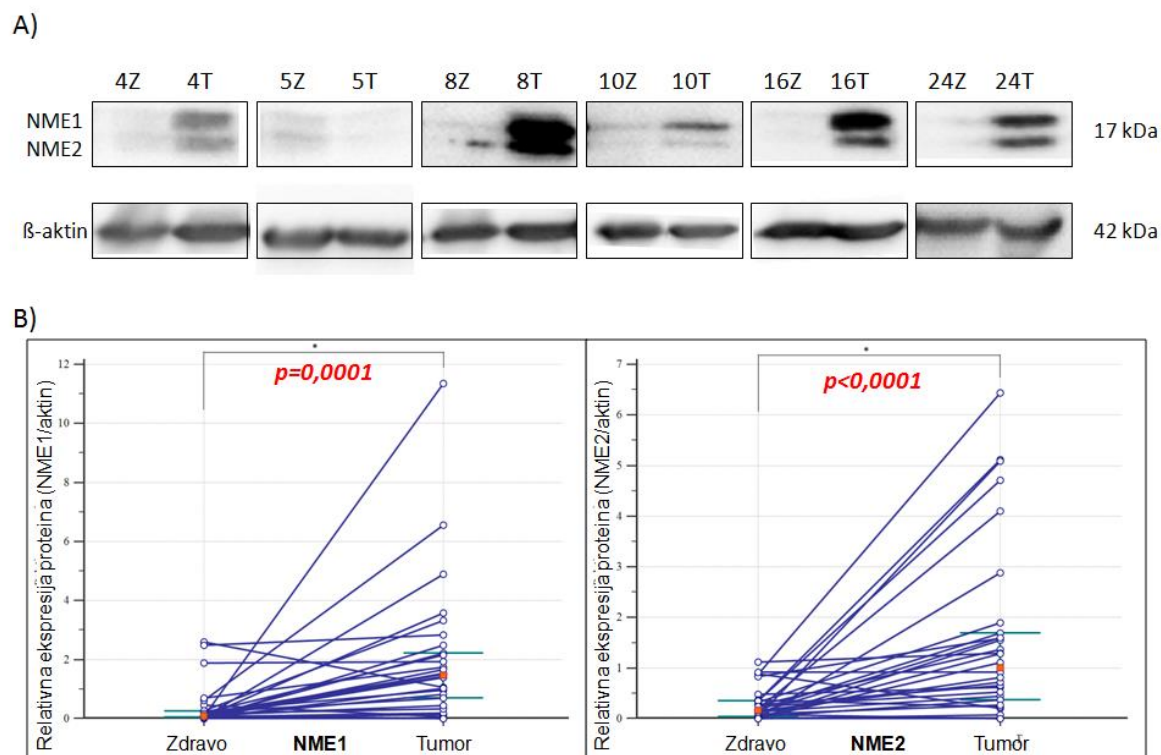
#### 4.3.3.1. Ekspresija proteina obitelji NME u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu

Sva tkiva eksprimiraju proteine iz obitelji NME. Protein NME1 zastupljen je u 28 (93%) tumorskih i 29 (97%) kontrolnih zdravih tkiva. Protein NME2 zastupljen je u 27 (90%) tumorskih i 27 (90%) kontrolnih zdravih tkiva (slika 46).



**Slika 46: Zastupljenost proteina NME1 i NME2 u tumorskim i zdravim tkivima.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-NME (NME1/2) koje prepoznaje proteine NME1 i NME2. Za kontrolu nanošenja uzoraka koristili smo protutijelo protu- $\beta$ -aktin. Rezultati pokazuju da su oba proteina, NME1 i NME2, zastupljena u gotovo svim tkivima.

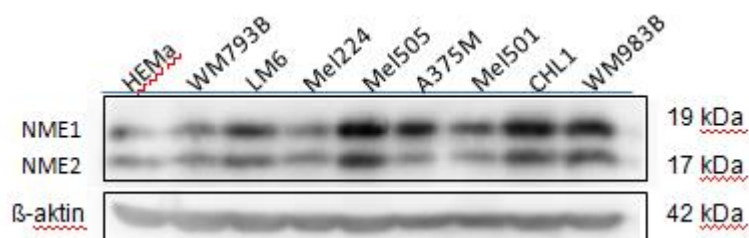
Uspoređujući ekspresiju proteina NME1 i NME2 u parovima tumorskih i zdravih tkiva, analiza SDS-PAGE i Western blot pokazuje da su u većini parova tumorskog i zdravog tkiva proteini NME1 i NME2 statistički značajno jače eksprimirani u tumorskim tkivima ( $p=0,0001$  i  $p<0,0001$ ). Nadalje, u tumorskim tkivima protein NME1 jače je eksprimiran (NME1/ $\beta$ -aktin = 1,98), od proteina NME2 (NME2/ $\beta$ -aktin = 1,59) (slika 47).



**Slika 47: Ekspresija proteina NME1 i NME2 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-NME1/2, te protu- $\beta$ -aktin (A). Densitometrijom smo odredili razinu ekspresije te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju proteina normaliziranu ekspresijom  $\beta$ -aktina. Razliku u ekspresiji analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina ( $p < 0,05$ ) označene su crvenom bojom (B). Rezultati pokazuju da su oba proteina, NME1 i NME2, statistički značajno jače ekspimirani u tumorskom tkivu.

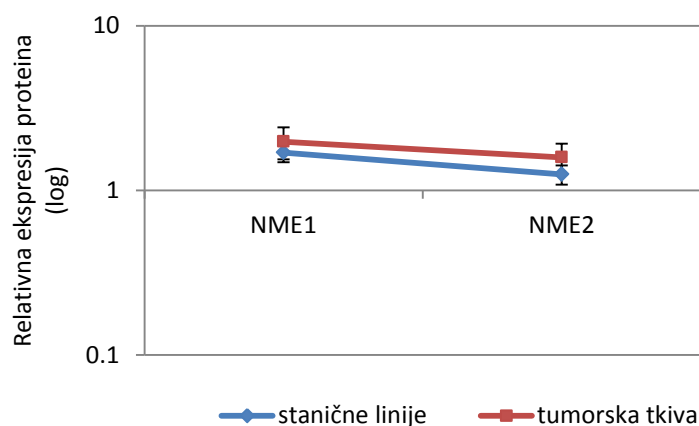
#### 4.3.3.2. Ekspresija proteina obitelji NME u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima

Rezultati analize SDS-PAGE i Western blot pokazuju da su proteini NME1 i NME2 ekspimirani u svim melanomskim staničnim linijama. U većini staničnih linija ekspresija proteina NME1 je jača od ekspresije proteina NME2. Nadalje, stanične linije s mutiranim genom *TP53* (Mel505, CHL1 i WM983B) imaju jaču ekspresiju proteina NME1 i NME2 za razliku od staničnih linija s divljim tipom *TP53* (slika 48).



**Slika 48: Ekspresija proteina NME1 i NME2 u staničnim linijama metastatskog melanoma čovjeka i kontrolnoj staničnoj liniji melanocita.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-NME1/2 koje prepoznaje oba proteina, te protu- $\beta$ -aktin. Sve stanične linije ekspresiraju proteine NME1 i NME2, s time da je NME1 jače ekspimiran.

Nadalje, istraživanjem razlike u ekspresiji proteina NME1 i NME2 između tumorskog tkiva i staničnih linija, usporedili smo srednju vrijednost ekspresije pojedinih proteina u tumorskim tkivima sa srednjom vrijednošću ekspresije pojedinih proteina u staničnim linijama melanoma te smo uočili da je njihova ekspresija gotovo podudarna (Slika 49).



**Slika 49: Usporedba srednjih vrijednosti relativne ekspresije proteina NME1 i NME2 svih tumorskih tkiva i svih staničnih linija melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijelo protu-NME1/2. Rezultati pokazuju da je ekspresija oba proteina NME1 i NME2, u staničnim linijama (plava linija) i tumorskim tkivima (crvena linija), gotovo podudarna.

#### 4.3.4. Ekspresija proteina obitelji GLI

Za određivanje ekspresije proteina iz obitelji GLI koristili smo metode SDS-PAGE i Western blot te specifičnim protutijelima odredili ekspresiju proteina Gli1 (izoforme Gli1\_160kDa, Gli1\_130kDa i Gli1\_118kDa), Gli2 (izoforme Gli2\_FL i Gli2\_133kDa) i Gli3 (izoforme Gli3\_A i Gli3\_R).

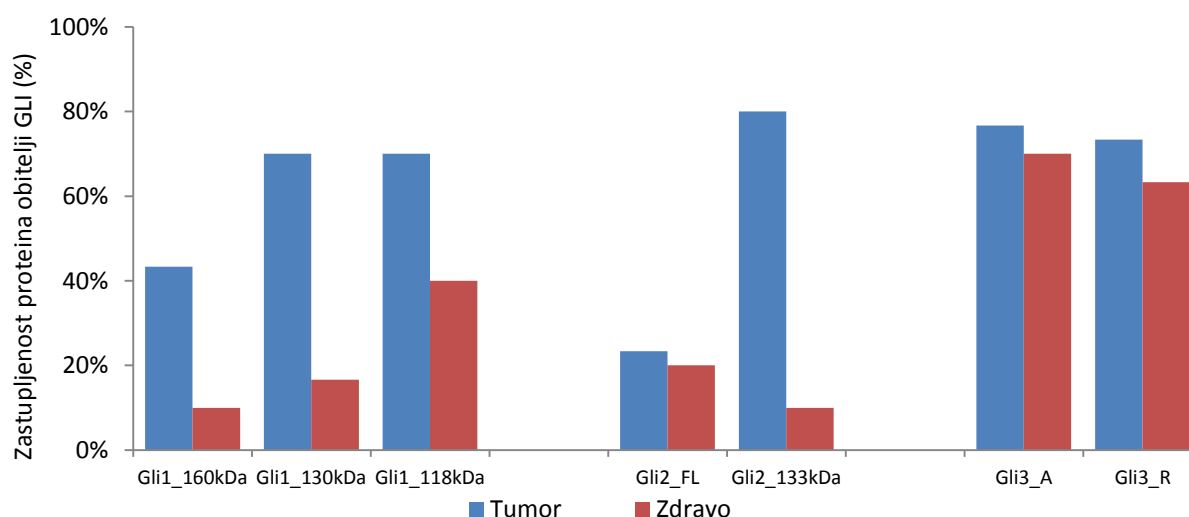
#### 4.3.4.1. Ekspresija proteina obitelji GLI u tkivima metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućem zdravom tkivu

Analiza proteina obitelji GLI pokazuje najvišu zastupljenost proteina/izoformi GLI3, nakon čega slijede proteini/izoforme GLI1 i GLI2.

Gledajući izoforme proteina GLI1, najzastupljenija izoforma je GLI1\_118kDa, nakon čega redom slijede GLI1\_130kDa i GLI1\_160kDa. Izoforma GLI1\_118kDa zastupljena je u 21 (70%) tumorskih i 12 (40%) kontrolnih zdravih tkiva, dok su izoforme GLI1\_130kDa i GLI1\_160kDa zastupljene u 21 (70%) tumorskih i 5 (17%) kontrolnih zdravih tkiva, odnosno u 13 (43%) tumorskih i 3 (10%) kontrolna zdrava tkiva (slika 50).

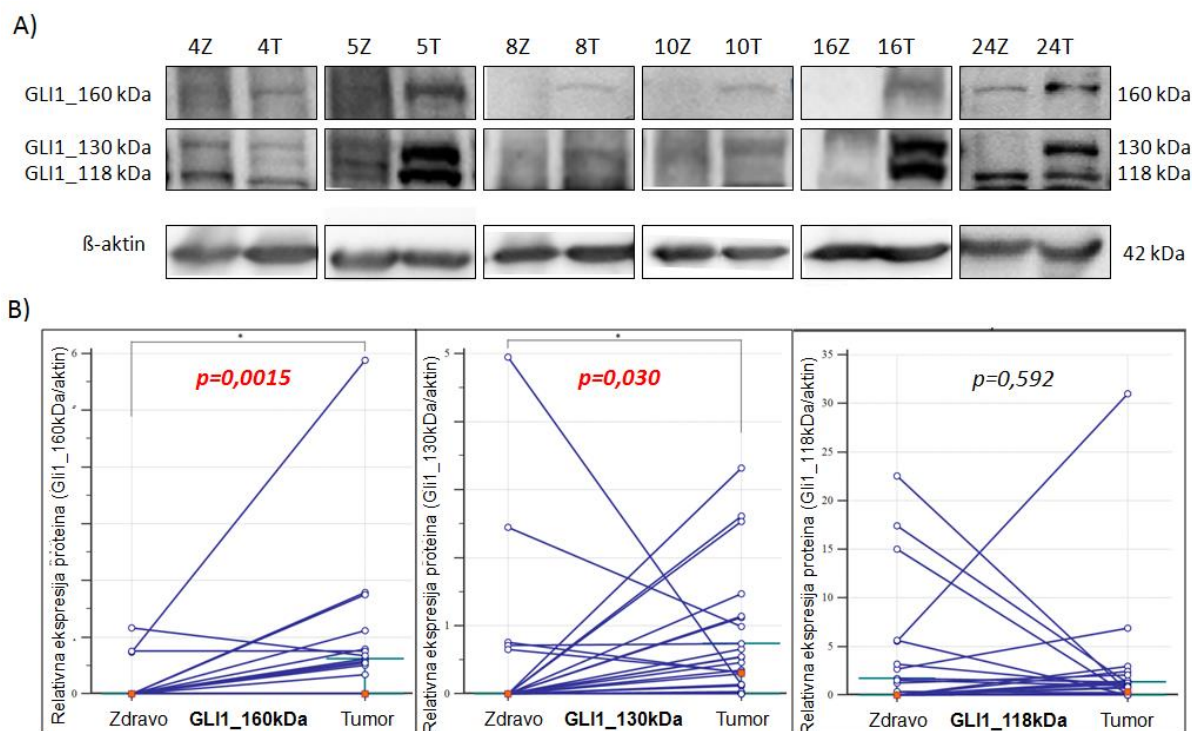
Gledajući izoforme proteina GLI2, najzastupljenija izoforma je GLI2\_133kDa, nakon čega slijedi izoforma GLI2\_FL. Izoforma GLI2\_133kDa zastupljena je u 24 (80%) tumorskih i 3 (10%) kontrolna zdrava tkiva, dok je izoforma GLI2\_FL zastupljena u 7 (23%) tumorskih i 6 (20%) kontrolnih zdravih tkiva (slika 50).

Kod izoformi proteina GLI3, najzastupljenija izoforma je GLI3\_A a slijedi ju izoforma GLI3\_R. Izoforma GLI3\_A zastupljena je u 23 (77%) tumorskih i 21 (70%) kontrolnih zdravih tkiva, dok je izoforma GLI3\_R zastupljena u 22 (73%) tumorskih i 19 (63%) kontrolnih zdravih tkiva (slika 50). Općenito gledajući, izoforme iz obitelji GLI su zastupljenije u tumorskim tkivima u odnosu na zdravo tkivo.



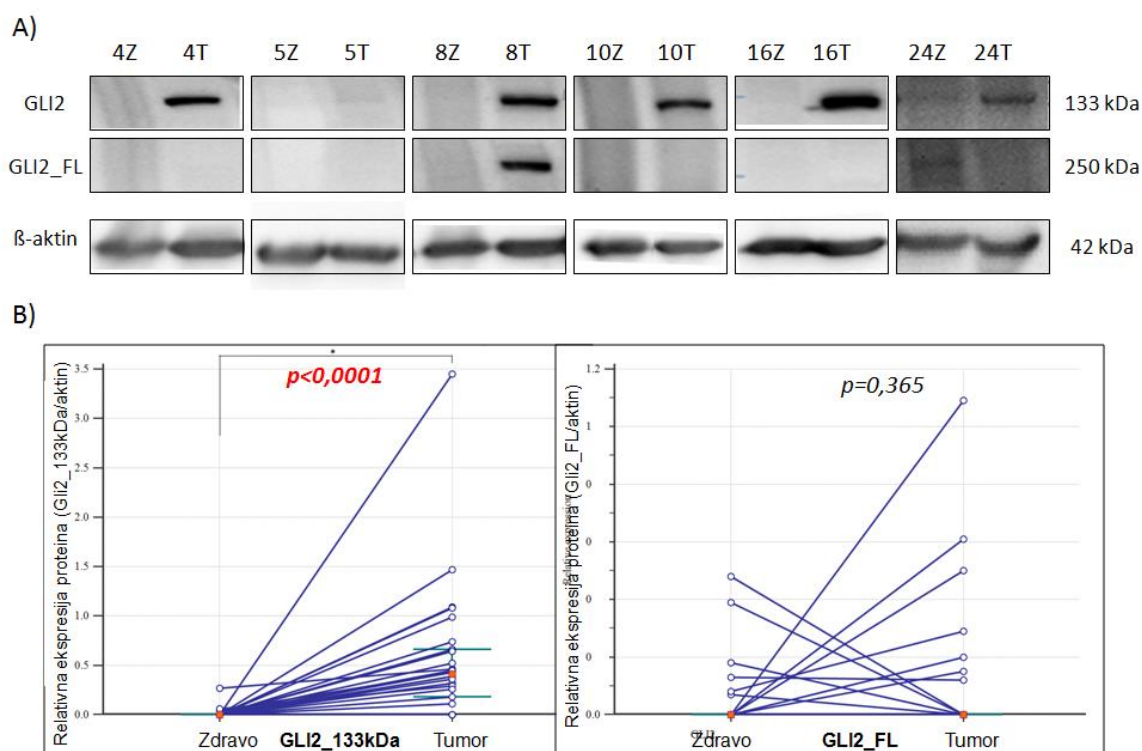
**Slika 50: Zastupljenost izoformi proteina GLI u tumorskim i kontrolnim zdravim tkivima.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifična protutijela protu-GLI1, protu-GLI2 i protu-GLI3. Za kontrolu nanošenja uzoraka koristili smo protutijelo protu- $\beta$ -aktin. Rezultati pokazuju da sva tkiva ekspimiraju neke od izoformi proteina GLI. Sve izoforme zastupljenije su u tumorskim tkivima.

Uspoređujući ekspresiju proteina GLI1 u parovima tumorskih i zdravih tkiva, našli smo da su u većini parova tumorskog i zdravog tkiva izoforme GLI1\_160 kDa i GLI1\_130 kDa statistički značajno jače eksprimirane u tumorskim tkivima ( $p=0,0015$  i  $p=0,030$ ). Nadalje, izoforma GLI1\_118kDa je najjače eksprimirana (relativna ekspresija GLI1\_118kDa/ $\beta$ -aktin = 1,89), dok je izoforma GLI1\_160kDa najmanje eksprimirana (relativna ekspresija GLI1\_160kDa/ $\beta$  aktin = 0,53) (slika 51).



**Slika 51: Ekspresija izoformi proteina GLI1 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i njegovog pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-Gli1, te protu- $\beta$ -aktin (A). Densitometrijom smo odredili razinu ekspresije te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju pojedinog proteina normaliziranu prema ekspresiji  $\beta$ -aktina. Razliku u ekspresiji proteina analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina ( $p<0,05$ ) označene su crvenom bojom (B). Rezultati pokazuju da su izoforme GLI1\_160 kDa i GLI1\_130 kDa statistički značajno jače eksprimirane u tumorskim tkivima.

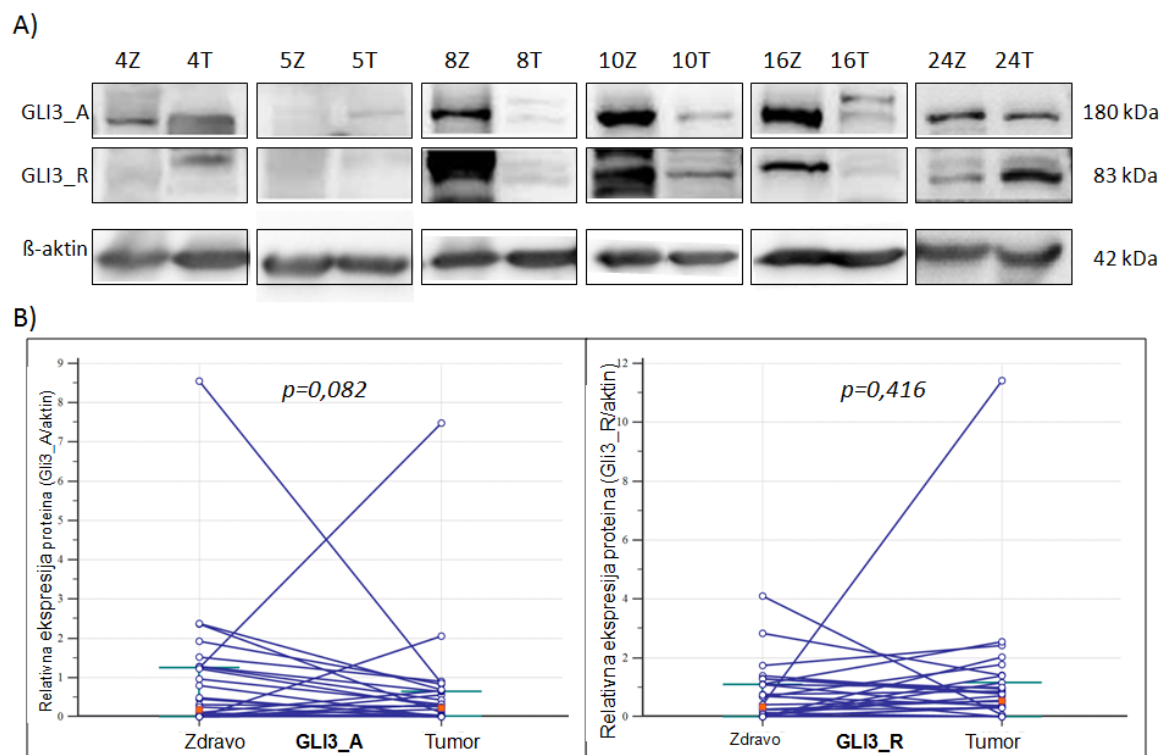
U većini parova tumorskog i zdravog tkiva izoforma GLI2\_133 kDa statistički je značajno jače eksprimirana u tumorskim tkivima nego u zdravima ( $p<0,0001$ ). Nadalje, izoforma GLI2\_133kDa je jače eksprimirana (GLI2\_133kDa/  $\beta$ -aktin = 0,54) od izoforme GLI2\_FL (GLI2\_FL/  $\beta$ -aktin = 0,10 )(slika 52).



**Slika 52: Ekspresija izoformi proteina GLI2 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i njegovog pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-Gli2, te protu- $\beta$ -aktin (A). Densitometrijom smo odredili razinu ekspresije proteina te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju pojedinog proteina normaliziranu prema  $\beta$ -aktinu. Razliku u ekspresiji proteina analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina ( $p < 0,05$ ) označene su crvenom bojom (B). Rezultati pokazuju da je izoforma GLI2\_133kDa statistički značajno jače eksprimirana u tumorskim tkivima.

Analiza Western blot pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji proteina GLI3 između tumorskog i zdravog tkiva. Izoforma GLI3\_R jače je eksprimirana ( $\text{GLI3\_R} / \beta\text{-aktin} = 1,07$ ) od izoforme GLI3\_A ( $\text{GLI3\_A} / \beta\text{-aktin} = 0,57$ ) (slika 53).



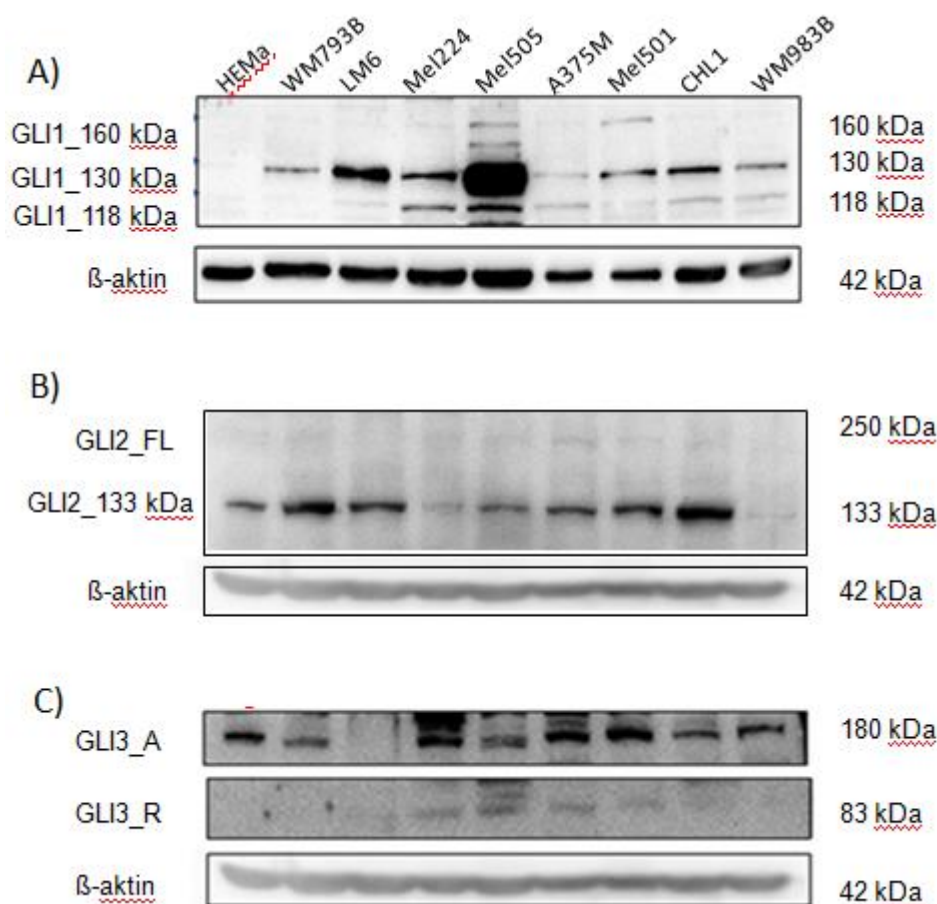


**Slika 53: Ekspresija izoformi proteina GLI3 u parovima metastatskog melanoma čovjeka i njegovog pripadajućeg zdravog tkiva.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifično protutijelo protu-Gli3, te protu- $\beta$ -aktin (A). Densitometrijom smo odredili razinu ekspresije proteina, te smo rezultate prikazali kao relativnu ekspresiju pojedinog proteina normaliziranu prema  $\beta$ -aktinu. Razliku u ekspresiji proteina analizirali smo Wilcoxonovim testom za sparane uzorke (B). Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji proteina GLI3\_A i GLI3\_R između tumorskih i zdravih tkiva.

#### 4.3.4.2. Ekspresija proteina obitelji GLI u stanicama metastatskog melanoma čovjeka i melanocitima

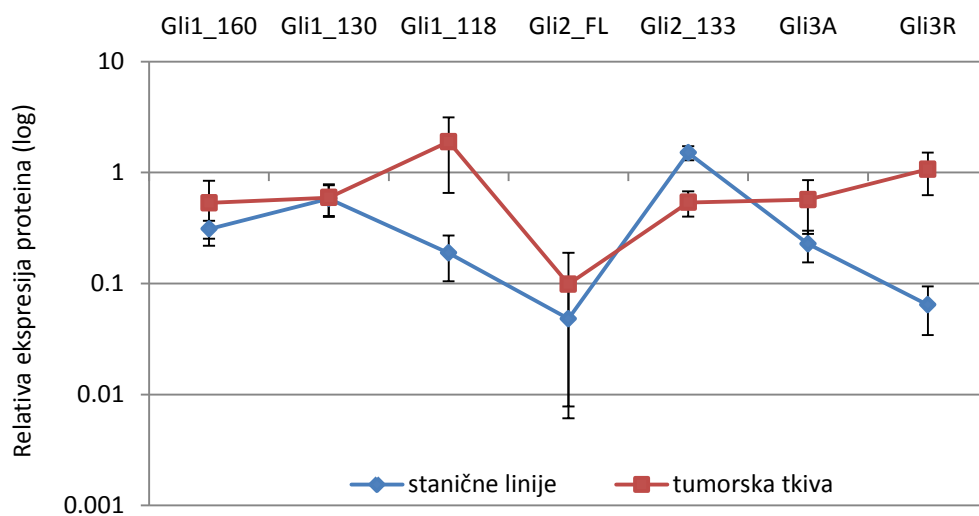
Rezultati Western blot analize pokazuju da su proteini obitelji GLI eksprimirani u svim melanomskim staničnim linijama, dok u melanocitima GLI1 nije detektiran.

U većini staničnih linija, kao i u tkivima, analiza Western blot pokazala je najveću ekspresiju izoformi GLI1\_130 kDa (slika 54 A), GLI2\_133kDa (slika 54 B) i GLI3\_A (slika 54 C).



**Slika 54: Ekspresija proteina obitelji GLI u staničnim linijama metastatskog melanoma čovjeka i kontrolnoj staničnoj liniji melanocita.** Ekspresiju proteina analizirali smo metodom SDS-PAGE i Western blot koristeći specifična protutijela protu-GLI1(A), protu-GLI2 (B) i protu-GLI3 (C), te protu- $\beta$ -aktin. Rezultati pokazuju da su izoforme GLI1\_130 kDa, GLI2\_133 kDa i GLI3\_A najjače eksprimirane u većini staničnih linija.

Nadalje, usporedili smo srednju vrijednost ekspresije pojedinih izoformi proteina u tumorskim tkivima sa srednjom vrijednošću ekspresije pojedinih izoformi proteina u staničnim linijama melanoma. Našli smo da je ekspresija proteina u staničnim linijama i tkivima metastatskog melanoma čovjeka raznolika, premda postoji isti trend. Ekspresija izoformi GLI1\_160 kDa, GLI1\_118 kDa, GLI2\_FL, GLI3\_A i GLI3\_R jača je u tumorskim tkivima u odnosu na stanične linije. S druge strane ekspresija izoforme GLI2\_133 kDa jača je u staničnim linijama u odnosu za tumorska tkiva. Jedino je ekspresija izoforme GLI1\_130 kDa ista u tumorskom tkivu i staničnim linijama (Slika 55).



**Slika 55: Usporedba srednjih vrijednosti relativne ekspresije izoformi proteina GLI svih tumorskih tkiva i svih staničnih linija melanoma.** Vrijednosti relativne ekspresije proteina analizirali smo metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći specifična protutijela protu-GLI1 za izoforme proteina GLI1, protu-GLI2 za izoforme proteina GLI2 i protu-GLI3 za izoforme proteina GLI3. Rezultati pokazuju da su izoforme GLI1\_160 kDa, GLI1\_118 kDa, GLI2\_FL, GLI3\_A i GLI3\_R ekspimirane jače u tumorskim tkivima (crvena linija) nego u staničnim linijama (plava linija). Izoforma GLI1\_130 kDa jednako je ekspimirana i u staničnim linijama i u tumorima, dok je izoforma GLI2\_133 kDa jače ekspimirana u staničnim linijama.

#### 4.4. Korelacijska analiza ekspresije proteina

Rezultati analize SDS-PAGE i Western blot u tumorskim tkivima pokazali su kako su izoforme proteina p53 ( $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$ ), proteina p73 ( $\Delta Np73\alpha$ ), proteini obitelji NME (NME1 i NME2), te proteini obitelji GLI (GLI1\_160, GLI1\_130, GLI2\_133) statistički značajno jače ekspimirani u tkivu metastatskog melanoma čovjeka u odnosu na zdravo tkivo.

Vrijednosti dobivene analizom SDS-PAGE i Western blot podvrgnuli smo korelacijskoj analizi. U tablici 24 navedeni su rezultati. Analiza je pokazala većinom pozitivne korelacije između proteina (35), dok je svega 6 korelacija negativno. Najveći broj korelacija pokazan je između izoformi proteina iz obitelji GLI i izoformi proteina p73 (11), dok je najmanji broj korelacija pokazan između proteina iz obitelji NME i ostalih proteina (jedna do dvije).

**Tablica 24: Tablica korelacijskih analiza proteinske ekspresije u tumorskim tkivima.** *P* označava statističku značajnost korelacije ( $P < 0,05$ ), dok  $\rho$  označava Spearmanov korelacijski koeficijent. Vrijednosti Spearmanova korelacijskog koeficijenta ( $\rho > 0,8$ ) označavaju vrlo jaku korelaciju (pozitivnu ili negativnu) između ekspresije dvaju proteina; vrijednosti ( $0,6 < \rho < 0,8$ ) označavaju jaku korelaciju između ekspresije dvaju proteina; vrijednosti ( $0,4 < \rho < 0,6$ ) označavaju umjerenu korelaciju između ekspresije dvaju proteina, dok vrijednosti ( $0,3 < \rho < 0,4$ ) označavaju slabu korelaciju između ekspresije dvaju proteina.

p53 $\beta$	$\Delta 40p53\alpha$	$\Delta 133p53\alpha$	$\Delta 133p53\beta$	$\Delta 160p53\alpha$	TAp73 $\alpha$	TAp73 $\beta$	$\Delta Np73\alpha$	$\Delta Np73\beta$	NME1	NME2	GLI1 (118 kDa)	GLI1 (130 kDa)	GLI1 (160 kDa)	GLI2 (133 kDa)	GLI2 (250 kDa)	GLI3A	GU3R	$\rho$	P
0,17	0,01	0,34	-0,43	0,48	0,55	0,73	0,41	0,34	0,28	0,24	0,49	0,32	0,60	0,28	-0,08	0,36	0,62	0,000	F
0,379	0,969	0,064	0,019	0,008	0,002	<0,0001	0,026	0,071	0,134	0,194	0,006	0,082	0,0004	0,136	0,660	0,050	0,000		F
-0,15	0,20	0,17	0,39	0,01	-0,14	-0,08	0,09	-0,10	-0,21	0,02	-0,05	-0,09	-0,04	0,09	-0,06	0,12	0,12		F
0,446	0,283	0,378	0,035	0,961	0,453	0,670	0,637	0,611	0,273	0,925	0,793	0,639	0,848	0,639	0,735	0,527	0,12		F
	0,33	-0,16	-0,11	-0,27	0,01	-0,12	0,12	0,08	0,31	0,00	0,20	0,20	0,10	-0,02	0,26	0,20	0,20		F
	0,077	0,400	0,561	0,150	0,957	0,543	0,531	0,671	0,093	0,995	0,298	0,301	0,608	0,938	0,168	0,297	0,12		F
		-0,53	0,40	0,17	0,40	0,28	0,27	0,31	0,41	0,40	0,12	0,11	0,45	0,09	-0,07	0,22	0,22		F
		0,002	0,030	0,362	0,029	0,129	0,150	0,093	0,027	0,027	0,531	0,577	0,012	0,625	0,726	0,237	0,237		F
		-0,26	-0,43	-0,54	-0,41	-0,15	-0,29	-0,29	-0,30	-0,34	-0,15	-0,35	-0,13	-0,13	-0,13	-0,38	0,20		F
		0,169	0,018	0,002	0,026	0,434	0,123	0,115	0,112	0,068	0,443	0,057	0,486	0,499	0,039	0,260	0,260		F
		0,48	0,16	0,46	-0,25	0,25	0,26	0,61	0,19	0,43	0,24	0,43	0,24	-0,23	-0,03	0,21	0,21		F
		0,008	0,408	0,010	0,179	0,191	0,173	0,000	0,328	0,017	0,204	0,214	0,214	0,873	0,260	0,260	0,260		F
					0,61	0,52	-0,14	0,23	0,32	0,38	0,49	0,39	0,27	0,11	0,38	0,19	0,19		F
					0,000	0,003	0,477	0,217	0,087	0,040	0,006	0,034	0,149	0,551	0,035	0,324	0,324		F
						0,35	0,27	0,25	0,34	0,39	0,42	0,40	0,20	0,17	0,28	0,47	0,47		F
						0,060	0,145	0,185	0,067	0,035	0,020	0,031	0,287	0,372	0,136	0,00	0,00		F
							0,02	0,38	0,36	0,58	0,47	0,52	0,34	-0,22	0,13	0,08	0,08		F
							0,939	0,040	0,050	0,001	0,010	0,003	0,070	0,233	0,509	0,686	0,686		F
								0,32	-0,24	0,01	-0,02	0,18	-0,08	-0,18	0,07	0,24	0,24		F
								0,087	0,198	0,948	0,931	0,342	0,666	0,333	0,711	0,209	0,209		F
									0,79	0,16	0,19	0,10	0,69	0,11	-0,01	0,16	0,16		F
									<0,0001	0,404	0,329	0,605	<0,0001	0,547	0,957	0,414	0,414		F
										0,33	0,33	0,25	0,59	0,02	0,13	0,02	0,02		F
										0,074	0,080	0,186	0,001	0,909	0,501	0,918	0,918		F
											0,44	0,63	0,11	-0,23	0,15	0,18	0,18		F
											0,016	0,0002	0,576	0,226	0,422	0,351	0,351		F
												0,69	0,18	-0,07	0,48	0,154	0,154		F
												<0,0001	0,353	0,724	0,007	0,154	0,154		F
													0,14	-0,45	0,33	0,32	0,32		F
													0,453	0,071	0,085	0,085	0,085		F
														0,20	0,06	0,04	0,04		F
														0,288	0,775	0,847	0,847		F
															0,31	0,21	0,21		F
															0,092	0,256	0,256		F
																0,38	0,38		F
																0,036	0,036		F

	+0,8
	+0,6
	+0,4
	+0,3
	-0,3
	-0,4
	-0,6
	-0,8

$\rho$  - Spearman rank correlation coefficient.

## 4.5. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI u uvjetima genotoksičnog stresa

Na temelju genske i proteinske ekspresijske analize staničnih linija melanoma, za daljnje pokuse odabrali smo dvije stanične linije, A375M (metastatski melanom) i WM793B (primarni melanom). Obje stanične linije imaju divlji tip gena *TP53* i mutirani gen *BRAF* (*BRAF<sup>V600E</sup>*), te eksprimiraju gotovo sve proteine od interesa. Eksperimenti iz ovog poglavlja provedeni su u suradnji s Martinom Radić, mag. chem.

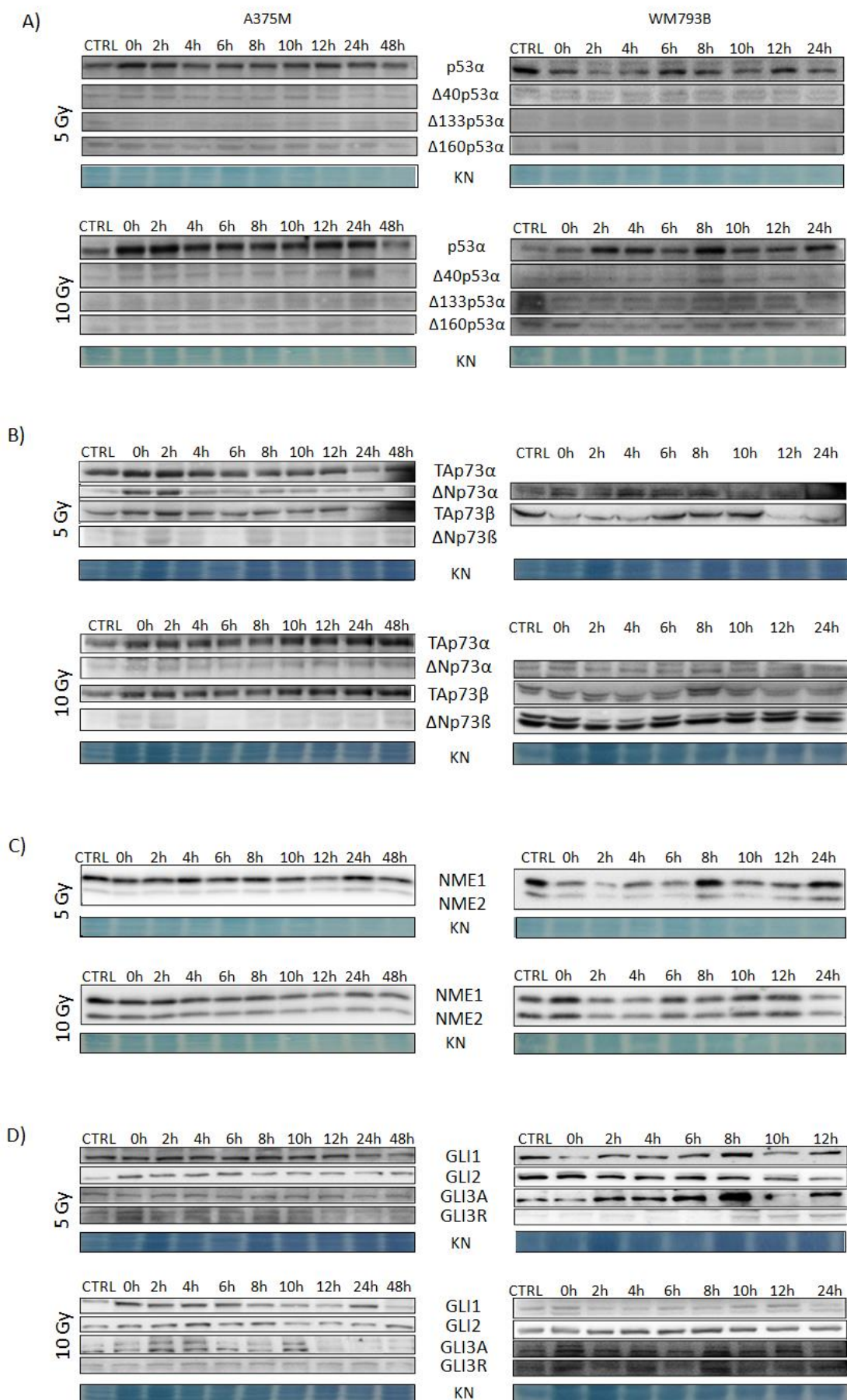
Kako bismo povećali količinu proteina od interesa stanične linije smo podvrgnuli genotoksičnom stresu - ionizirajućem zračenju i protutumorskim lijekovima.

### 4.5.1. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI u stanicama melanoma čovjeka nakon izlaganja stanica ionizirajućem $\gamma$ -zračenju

Stanične linije, A375M i WM793B podvrgnuli smo različitim dozama ionizirajućeg  $\gamma$ -zračenja (5 i 10 Gy). Stanice smo promatrali i prikupljali u različitim vremenskim razdobljima (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 i 48 sati) nakon izlaganja zračenju, te smo iz njih izolirali ukupne proteine i analizirali ih metodama SDS-PAGE i Western blot.

Promatrajući obje stanične linije pod svjetlosnim mikroskopom uočili smo da stanice nakon izlaganja  $\gamma$ -zračenju ne podliježu staničnoj smrti, nego naprotiv, još brže rastu.

Istraživanjem ekspresije proteina obitelji p53/p73, NME i GLI uočili smo da ne dolazi do značajnih promjena u njihovoj ekspresiji kao odgovor stanica na zračenje. Slika 56 prikazuje da se razina ekspresije izoformi proteina p53 ( $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 133p53\alpha$ ,  $\Delta 160p53\alpha$ ) ne povećava tijekom vremena kao odgovor stanica na zračenje. Jedino je razina ekspresije proteina p53 $\alpha$  blago povećana, no ne pokazuje klasičan obrazac ponašanja proteina p53 u odgovoru na oštećenje DNA (slika 56 A). Nadalje, razina ekspresije izoformi proteina p73 (slika 56 B), proteina NME1 i NME2 (slika 56 C) ne povećava se tijekom vremena kao odgovor stanica na  $\gamma$ -zračenje. S druge strane, razina ekspresije proteina GLI1, GLI2 i GLI3 blago se smanjuje tijekom vremena u staničnoj liniji A375M (slika 56 D). Sveukupno, rezultati analize Western blot pokazuju da tretman ionizacijskim zračenjem nije prikladna metoda za povećanje ekspresije proteina od interesa u staničnim linijama melanoma.



-opis slike na idućoj stranici-

**Slika 56: Razina ekspresije izoformi proteina p53 i p73, te proteina obitelji NME i GLI u odgovoru na ionizirajuće zračenje.** Stanice smo podvrgnuli  $\gamma$ -zračenju (5 i 10 Gy), te smo ih prikupljali u različitim vremenskim razdobljima (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 i 48 sati) nakon izlaganja zračenju i potom ih analizirali metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53 (SAPU), protu-p73 (EP436Y), protu-NME1/2, protu-GLI1, protu-GLI2 i protu-GLI3. Rezultati pokazuju da se razina ekspresije izoformi proteina p53 (A), p73 (B), i NME (C) ne mijenja u odgovoru na ionizirajuće zračenje. S druge strane, ekspresija proteina GLI1, GLI2 i GLI3 (D) blago se smanjuje u staničnoj liniji A375M.

#### **4.5.2. Ekspresija proteina obitelji p53, p73, NME i GLI u stanicama melanoma čovjeka nakon izlaganja stanica protutumorskim lijekovima**

Stanične linije A375M i WM793B podvrgnuli smo tretmanu protutumorskih lijekova cisplatinu i etopozidu. Stanice smo promatrali i prikupljali u različitim vremenskim razdobljima (24, 48 i 72 sata) nakon izlaganja pojedinom protutumorskom lijeku, te smo iz stanica izolirali ukupne proteine i proveli analizu SDS-PAGE i Western blot.

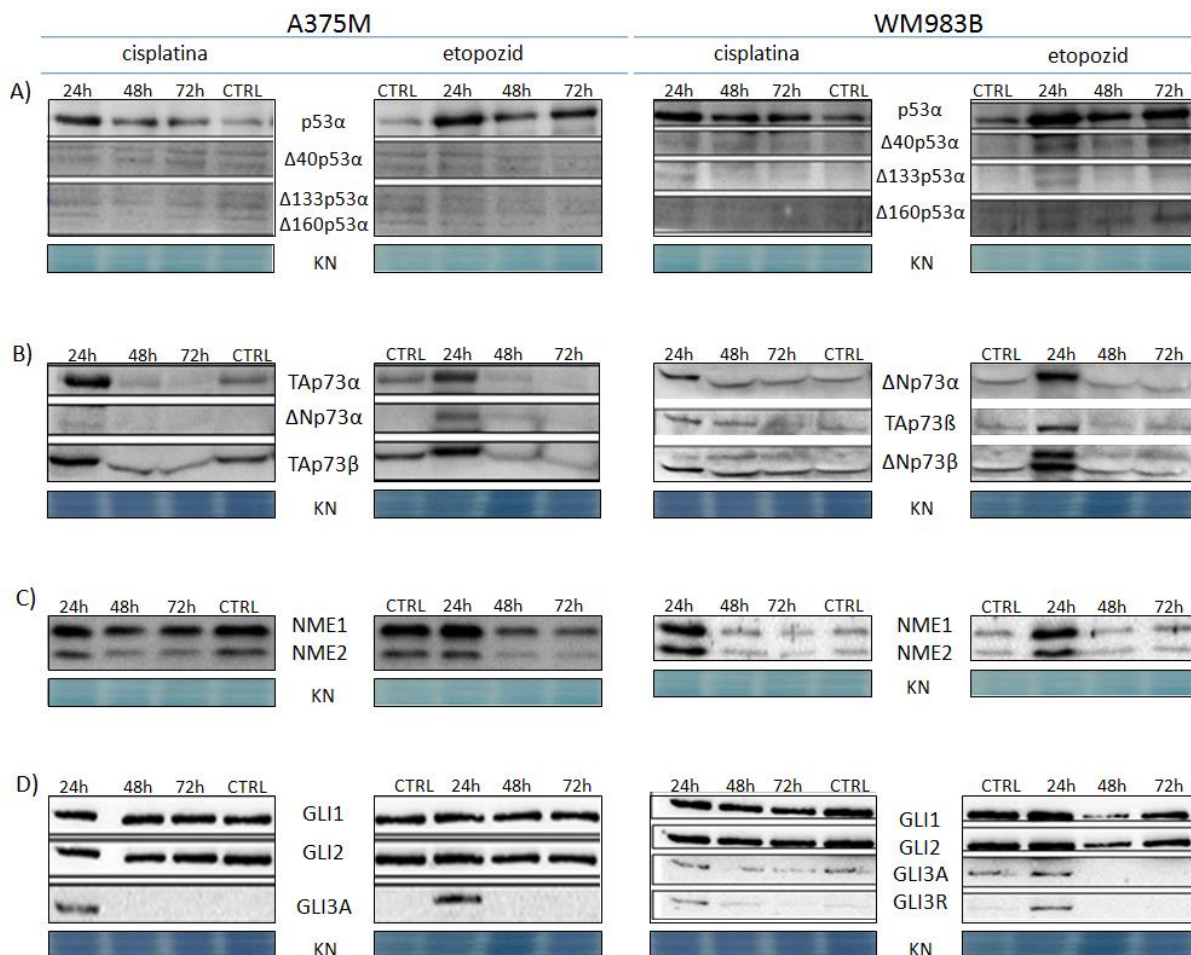
Prije samog tretiranja stanica lijekovima, testom MTT odredili smo dozu u kojoj 50% stanica umire ( $IC_{50}$ ). Obje stanične linije pokazale su da cisplatinu i etopozid u koncentracijama od 1  $\mu$ M izazivaju smrt u 50% stanica, stoga smo te koncentracije odabrali za daljnje pokuse.

Promatrajući stanične linije pod svjetlosnim mikroskopom uočili smo da stanice nakon izlaganja protutumorskim lijekovima umiru. Zbog toga smo istražili ekspresiju proteina obitelji p53/p73, NME i GLI kao odgovor na kemoterapeutike.

Rezultati pokazuju da razina ekspresije p53 $\alpha$  raste 24 sata nakon izlaganja stanica cisplatinu i etopozidu u obje stanične linije u odnosu na kontrolne netretirane stanice. Ekspresija ostalih izoformi je nepromijenjena (slika 57 A). Također smo uočili da se razina ekspresije svih izoformi proteina p73 (slika 75 B) i proteina obitelji NME (slika 75 C) povećava 24 sata nakon izlaganja cisplatinu i etopozidu u obje stanične u odnosu na kontrolne netretirane stanice. Analiza proteina obitelji GLI pokazala je da se jedino razina ekspresije proteina GLI3 povećava 24 h nakon izlaganja cisplatinu i etopozidu u obje stanične linije, dok je razina proteina GLI1 i GLI2 ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolne netretirane stanice (slika 75 D).

Rezultati analize SDS-PAGE i Western blot pokazali su da stanične linije melanoma reagiraju na tretmane protutumorskim lijekovima. Dvadeset i četiri sata nakon tretmana razina

ekspresije većine proteina od interesa povećala se u odnosu na kontrolne netretirane stanice. Upravo zbog toga, tretman etopozidom ćemo koristiti u daljnjim analizama.



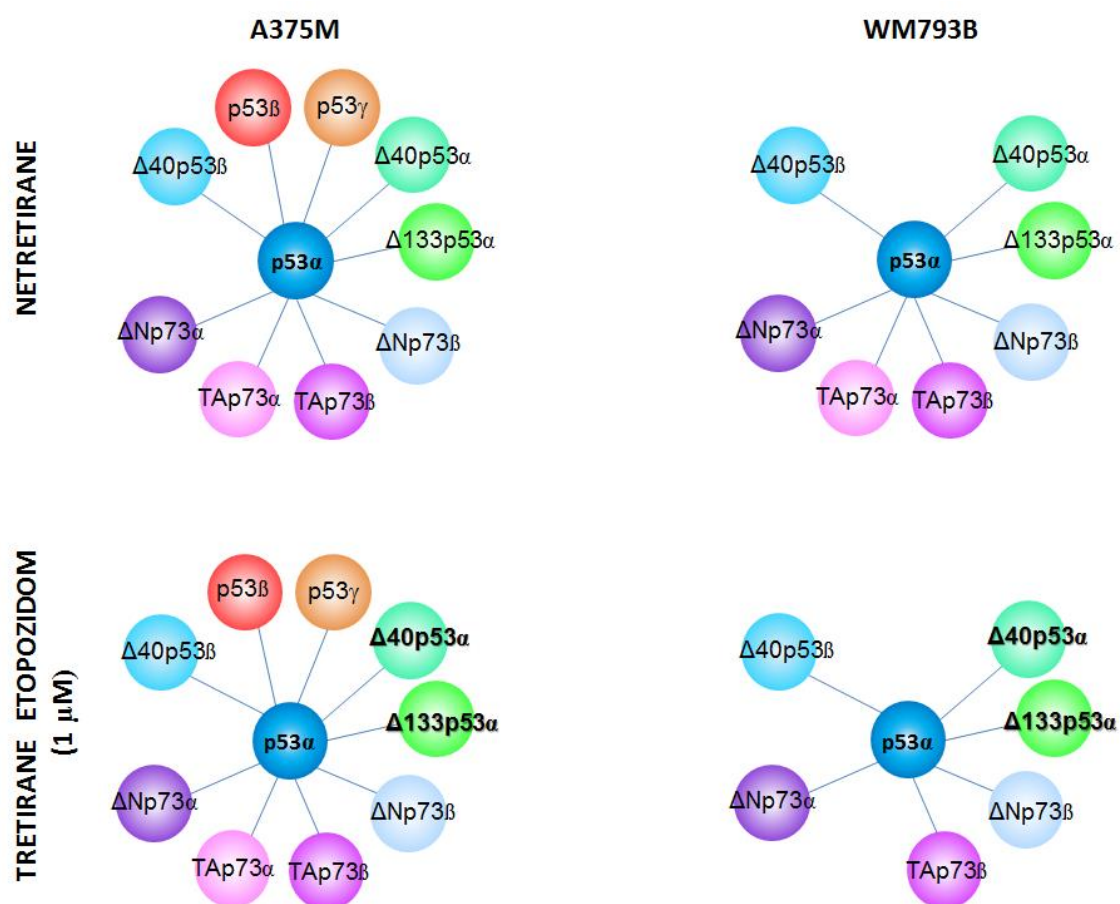
**Slika 57: Razina ekspresije izoformi proteina p53 i p73, te proteina obitelji NME i GLI u odgovoru na protutumorske lijekove.** Stanice smo podvrgnuli djelovanju cisplatine i etopozida u koncentraciji od 1 μM, te smo ih prikupljali u različitim vremenskim razdobljima i potom ih analizirali metodama SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53 (SAPU), protu-p73 (EP436Y), protu-NME1/2, protu-GLI1, protu-GLI2 i protu-GLI3. Rezultati pokazuju da se razina ekspresije izoforme p53α (A), svih izoformi p73 (B), proteina NME1 i NME2 (C), te GLI3 (D) povećava kao odgovor na protutumorske lijekove.



## 4.6. Interakcije proteina p53 s izoformama p53/p73, te proteinima NME i GLI u staničnim linijama melanoma čovjeka

Stanične linije A375M i WM793B koristili smo kako bi metodom koimunoprecipitacije u staničnim linijama melanoma čovjeka odredili interakcije između proteina p53 i proteina od interesa, prvenstveno izoformi p53 i p73, te proteinima iz obitelji NME i GLI.

U svrhu povećanja ekspresije proteina p53, stanične linije tretirali smo etopozidom tijekom 24 sata u koncentraciji od 1  $\mu\text{M}$  za koju smo utvrdili da povećava ekspresiju većine proteina od interesa (slika 57). Nadalje, u stanice smo dodatno unijeli gen *TP53* fuzioniran s privjeskom FLAG kako bi pronašli nove interakcije. Sažetak rezultata prikazan je na slici 58.



**Slika 58: Stvaranje kompleksa između proteina p53 $\alpha$  i proteina p53/p73 u staničnim linijama melanoma čovjeka.** Lizate stanica (1 mg) imunoprecipitirali smo protutijelom protu-p53 (DO1) ili protu-53 FLAG. Komplekse između proteina p53 $\alpha$  i izoformi p53 i p73 detektirali smo analizom SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53 i protu-p73. Rezultati pokazuju izravne proteinske interakcije između proteina p53 $\alpha$  i izoformi p53, te između proteina p53 $\alpha$  i izoformi p73. Izravne proteinske interakcije između proteina p53 $\alpha$  i proteina obitelji NME i GLI nismo pronašli.

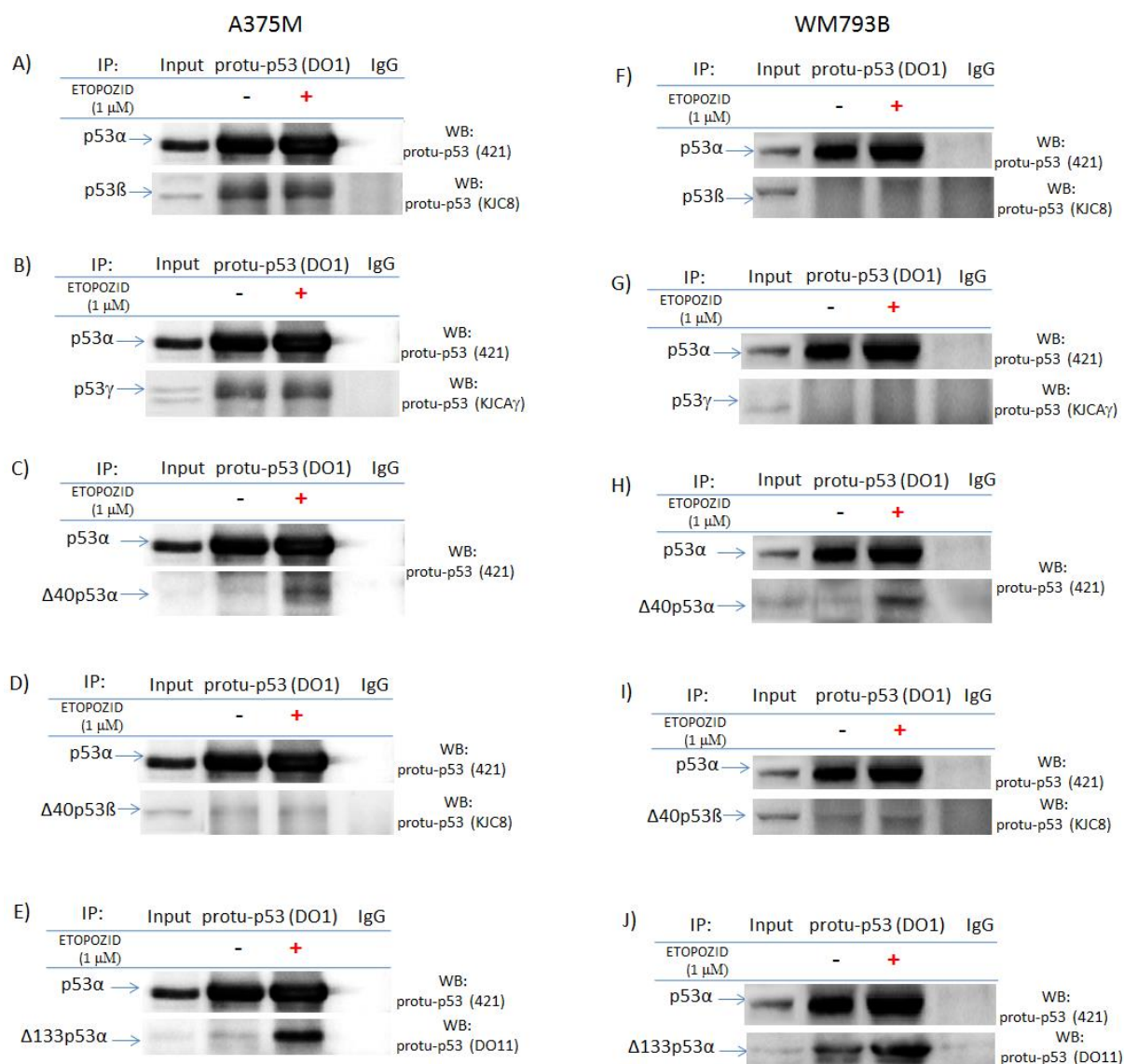
Rezultati ko-immunoprecipitacije pokazuju da u melanomskim staničnim linijama postoje izravne proteinske interakcije između proteina p53 $\alpha$  i izoformi p53 (p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ) i p73(TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$ ), dok interakcije između proteina obitelji NME i GLI nisu pronađene.

#### **4.6.1. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s izoformama p53 u staničnim linijama melanoma čovjeka**

Metodom ko-immunoprecipitacije pokazali smo postojanje kompleksa između endogenih proteina p53 $\alpha$  i p53 $\beta$  (slika 59 A), te p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$  (slika 59 B) u staničnoj liniji A375M. U staničnoj liniji WM793B interakcije između endogenih proteina p53 $\alpha$  i p53 $\beta$  (slika 59 F), te između p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$  (slika 59 G) nismo pronašli. Isti pokus ponovili smo nakon tretmana stanica etopozidom u koncentraciji od 1  $\mu$ M i uočili da taj tretman nema utjecaja na stvaranje kompleksa između p53 $\alpha$  i p53 $\beta$  ili na kompleks između p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$  (slika 59 A, B, F i G).

Nadalje, u endogenim smo uvjetima pokazali postojanje kompleksa između p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  (slika 59 C i H), p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\beta$  (slika 59 D i I), te između p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  (slika 59 E i J) u obje melanomske stanične linije. Zatim, uočili smo da tretman etopozidom pospješuje nastajanje kompleksa između p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ , te između p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  u obje ispitane stanične linije (slika 59 C, H, E i J).

U uvjetima ektopično eksprimiranog proteina p53 nismo pronašli niti jedan kompleks između proteina p53 $\alpha$  i njegovih izoformi, te stoga te slike nismo prikazivali.

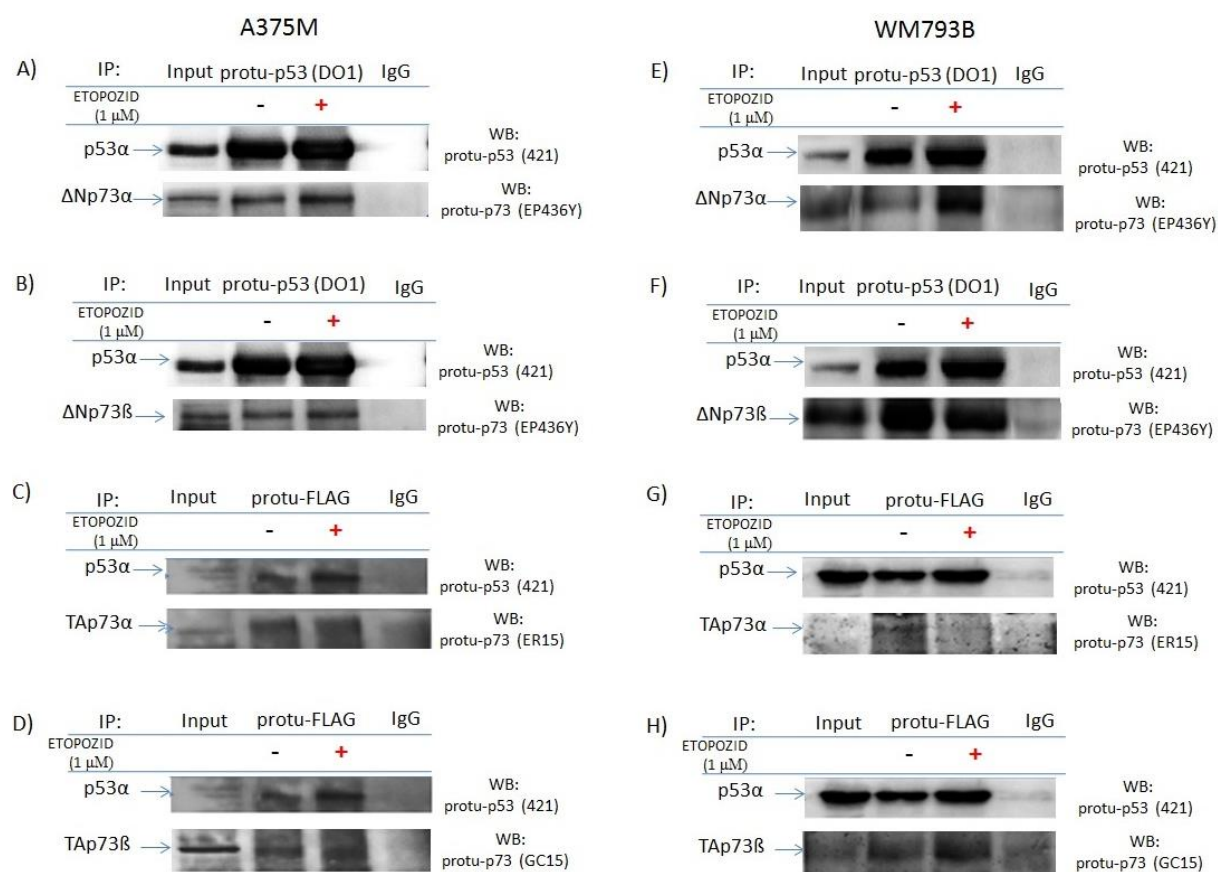


**Slika 59: Stvaranje kompleksa između endogenog p53α i izoformi p53.** Lizate stanica A375M i WM793B (1 mg) imunoprecipitali smo protutijelom protu-p53 (DO1), a komplekse između proteina detektirali smo analizom SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53: 421 i DO11 za izoforme alfa, KJC8 za izoforme beta i KJCAγ za izoforme gama. U staničnoj liniji A375M pronašli smo komplekse između proteina p53α i p53β (A), između p53α i p53γ (B), između p53α i Δ40p53α (C), između p53α i Δ40p53β (D), te između p53α i Δ133p53α (E), dok smo u staničnoj liniji WM793B pronašli komplekse samo između između p53α i Δ40p53α (H), između p53α i Δ40p53β (I) i između p53α i Δ133p53α (J). Komplekse između p53α i p53β (F), te između p53α i p53γ (G) u staničnoj liniji WM793B nismo pronašli. Sve interakcije pronađene su u endogenim uvjetima.

### 4.6.2. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s izoformama p73 u staničnim linijama melanoma čovjeka

Metodom ko-imunoprecipitacije pokazali smo nastajanje kompleksa između endogenih proteina p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (slika 60 A i E), odnosno p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  (slika 60 B i F) u obje melanomske stanične linije bez i s tretmanom etopozidom. Tretman etopozidom ne utječe na formiranje kompleksa.

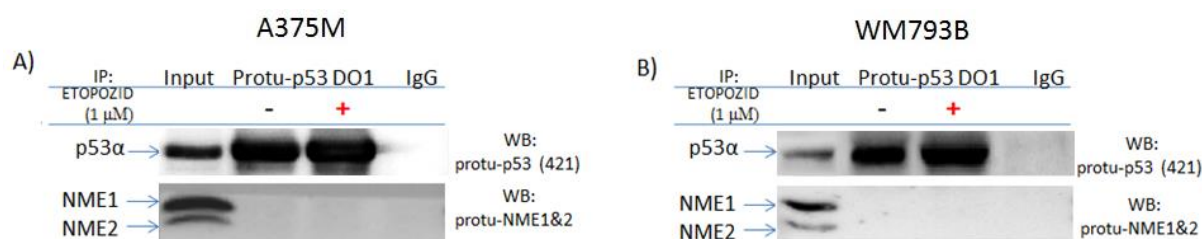
Nadalje, pokazali smo i postojanje kompleksa između p53 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$  (slika 60 C i G), te između p53 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  (slika 60 D i H) u obje melanomske stanične linije uslijed transfekcije gena *TP53*. Nadalje, uočili smo da tretman etopozidom pospješuje stvaranje kompleksa između p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u staničnoj liniji WM793B (slika 60 E), te istovremeno destabilizira kompleks između p53 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$  u istoj staničnoj liniji (slika 60 G).



**Slika 60: Stvaranje kompleksa između p53 $\alpha$  i izoformi p73.** Lizate stanica A375M i WM793B (1 mg) imunoprecipitali smo protutijelom protu-p53 (DO1) u endogenim uvjetima i protu-FLAG u uvjetima ekotipično eksprimiranog proteina p53, a proteinske komplekse detektirali smo analizom SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53 (421) i protu-p73 (GC15, ER15 i EP436Y). U obje stanične linije našli smo komplekse između proteina p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (A, E), te između p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  (B, F) u endogenim uvjetima, dok smo komplekse između proteina p53 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$  (C, G), te između p53 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  (D, H) pronašli u uvjetima ekotipično eksprimiranog p53.

### 4.6.3. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s proteinima obitelji NME u staničnim linijama melanoma čovjeka

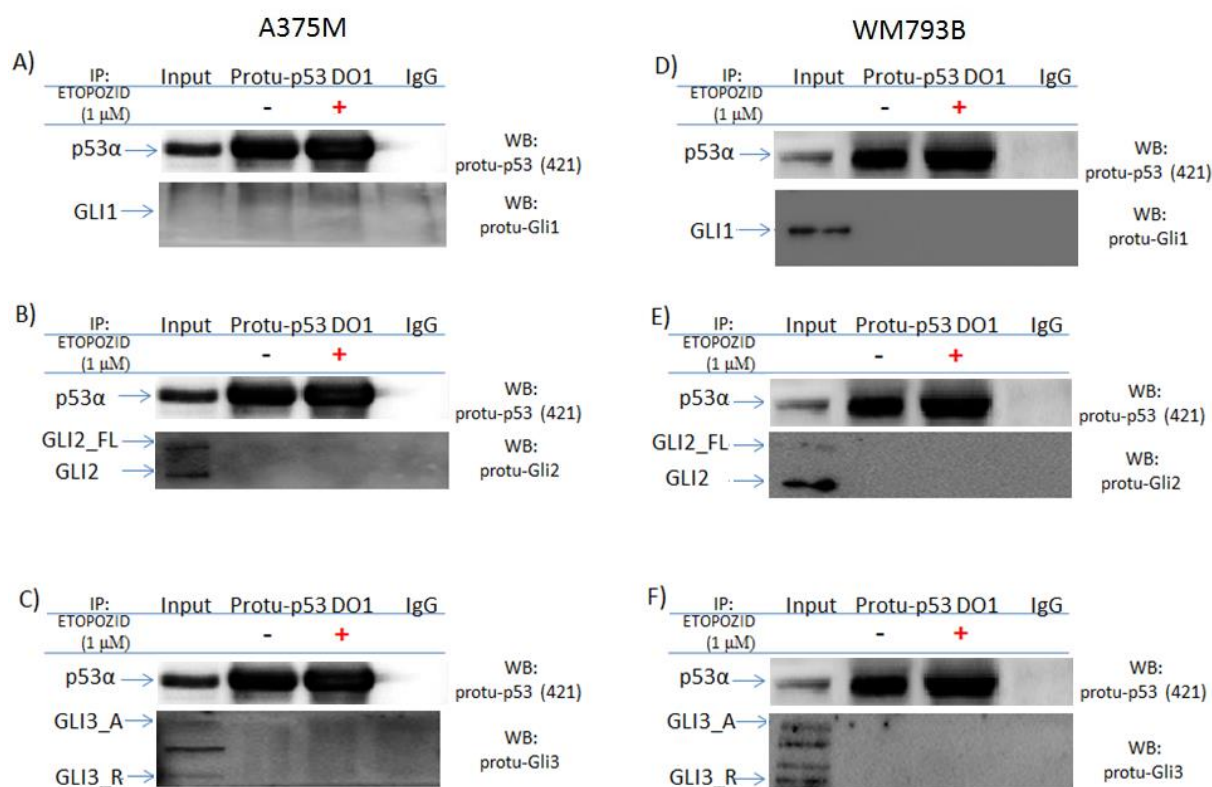
Metodom ko-immunoprecipitacije nismo dokazali komplekse između proteina p53 $\alpha$  i proteina iz obitelji NME (NME1 i NME2) u melanomskim staničnim linijama A375M (slika 61 A) i WM793B (slika 61 B), niti endogeno niti nakon transfekcije gena *TP53*.



**Slika 61: Kompleksi između p53 $\alpha$  i proteina NME1 i NME2 nisu pronadeni.** Lizate stanica A375M i WM793B (1 mg) imunoprecipitali smo protutijelom protu-p53 (DO1), a komplekse između proteina pokušali smo detektirati analizom SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53 (421), te protu-NME1/2. Niti u stanicama A375M (A), niti u WM793B (B) nismo dokazali komplekse između proteina p53 $\alpha$  i NME1, odnosno između p53 $\alpha$  i NME2.

#### 4.6.4. Interakcije proteina p53 $\alpha$ s proteinima obitelji GLI u staničnim linijama melanoma čovjeka

Metodom ko-imunoprecipitacije nismo dokazali komplekse između p53 $\alpha$  i GLI1 (slika 62 A i D), p53 $\alpha$  i GLI2 (slika 62 B i E), te između p53 $\alpha$  i GLI3 (slika 62 C i F) u melanomskim staničnim linijama, niti endogeno niti nakon transfekcije gena *TP53*.



**Slika 62: Kompleksi između p53 $\alpha$  i proteina GLI1, GLI2 i GLI3 nisu pronađeni.** Lizate stanica A375M i WM793B (1 mg) imunoprecipitali smo protutijelom protu-p53 (DO1), a komplekse između proteina pokušali smo detektirati analizom SDS-PAGE i Western blot koristeći protutijela protu-p53 (421), protu-GLI1, protu-GLI2 i protu-GLI3. Niti u jednoj staničnoj liniji nismo dokazali postojanje kompleksa između p53 $\alpha$  i GLI1 (A, D), p53 $\alpha$  i GLI2 (B, E), te p53 $\alpha$  i GLI3(C, F).

#### 4.7. Utjecaj proteina p53/p73, NME i GLI na transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$

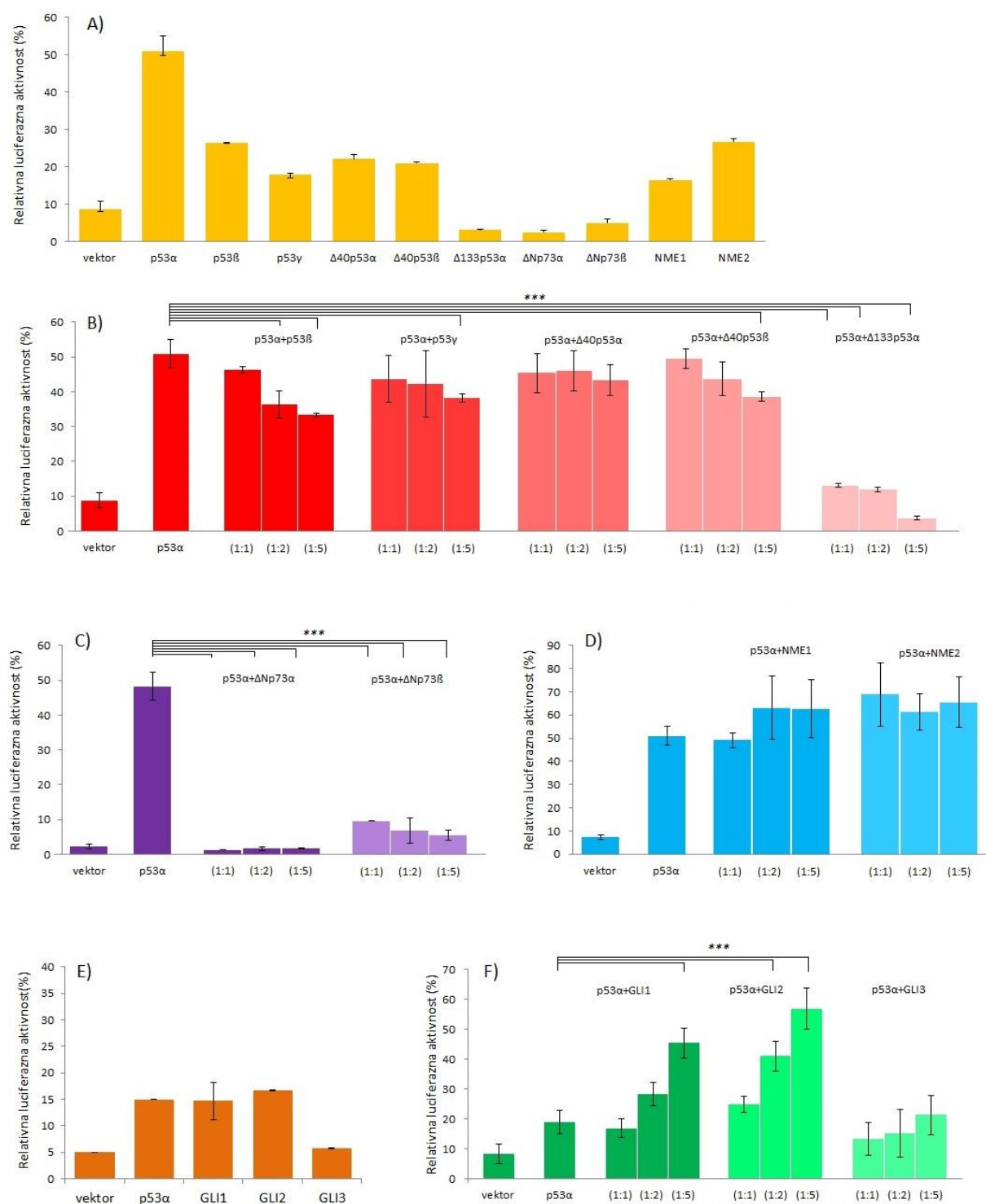
Kako bi utvrdili utječu li proteini od interesa na transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  koristili smo test aktivnosti luciferaze. Staničnu liniju A375M najprije smo transficirali rastućim količinama proteina p53 $\alpha$  (2, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 ng) kako bi pomoću baždarnog dijagrama aktivnosti luciferaze odredili koju ćemo količinu proteina p53 $\alpha$  koristiti u testu aktivnosti luciferaze. Titracijom smo odredili da je 50 ng proteina p53 $\alpha$  idealna količina u našem sustavu kako bi aktivnost luciferaze bila u sredini eksponencijalne faze tj iznosila 50% maksimalne aktivnosti.

Kako bi utvrdili utjecaj izoformi proteina p53 i p73 koje su tvorile komplekse s proteinom p53 $\alpha$ , te proteina obitelji NME i GLI na transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ , staničnu liniju A375M prolazno smo transficirali plazmidima od interesa, samima i u kombinaciji s p53 $\alpha$  u različitim množinskim omjerima.

Rezultati pokazuju kako izoforme p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\beta$ , te proteini NME1 i NME2 imaju bazičnu transkripcijsku aktivnost. Naime, oni sami, mogu aktivirati transkripciju ciljnih gena p53 (slika 63 A) u odnosu na kontrolu tj. prazni vektor. S druge strane, izoforme  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  ne potiču transkripciju ciljnih gena p53 (slika 63 A). Proteini GLI1 i GLI2 mogu aktivirati transkripciju ciljnih gena p53 jedankim učinkom kao i sam p53 (slika 63 E), dok GLI3 inhibira transkripciju ciljnih gena p53 (slika 63 E).

Rezultati kotransfekcije pokazuju da izoforme p53 (p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ) smanjuju transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ , no s različitim učinkom. Tako se transkripcijska aktivnost proteina p53 $\alpha$  blago smanjuje s povećanjem količine izofomi p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$  i  $\Delta$ 40p53 $\beta$  (slika 63 B) za otprilike 30%, a izoforma  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  (slika 63 B) u potpunosti inhibira transkripcijsku aktivnost proteina p53, isto kao i izoforme p73 -  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  (slika 63 C).

Proteini obitelji NME (NME1 i NME2) blago povećavaju transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  za 30% (slika 63 D), dok proteini obitelji GLI imaju dvojako djelovanje. Naime, GLI1 i GLI2 povećavaju transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  proporcionalno količini. S druge strane protein GLI3 nema značajnijeg utjecaja na transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  (slika 63 F).



**Slika 63: Utjecaj izoformi p53/p73, te proteina NME i GLI na transkripcijsku aktivnost p53α.** Lizate stanica A375M prolazno smo transficirali ekspresijskim vektorima p53α, p53β, p53γ, Δ40p53α, Δ40p53β, Δ133p53α, ΔNp73α, ΔNp73β, NME1, NME2, GLI1, GLI2 i GLI3 u množinskim omjerima 1:1, 1:2 i 1:5 te smo nakon 24h (za izoforme p53, p73 i proteine NME) tj 48h (za proteine GLI) mjerili luciferaznu aktivnost. Srednju vrijednost i standardnu grešku relativnih luciferaznih aktivnosti izračunali smo iz tri nezavisna pokusa u duplikatima. Razlike relativne luciferazne aktivnosti analizirali smo testom ANOVA-om i Tukey HSD. Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina ( $p < 0,05$ ) označili smo zvjezdicom (\*). Rezultati pokazuju da izoforme proteina p53 i p73 smanjuju transkripcijsku aktivnost proteina p53α, proteini NME1 i NME2, te GLI1 i GLI2 povećavaju, dok protein GLI3 nema utjecaja na transkripcijsku aktivnost proteina p53α.

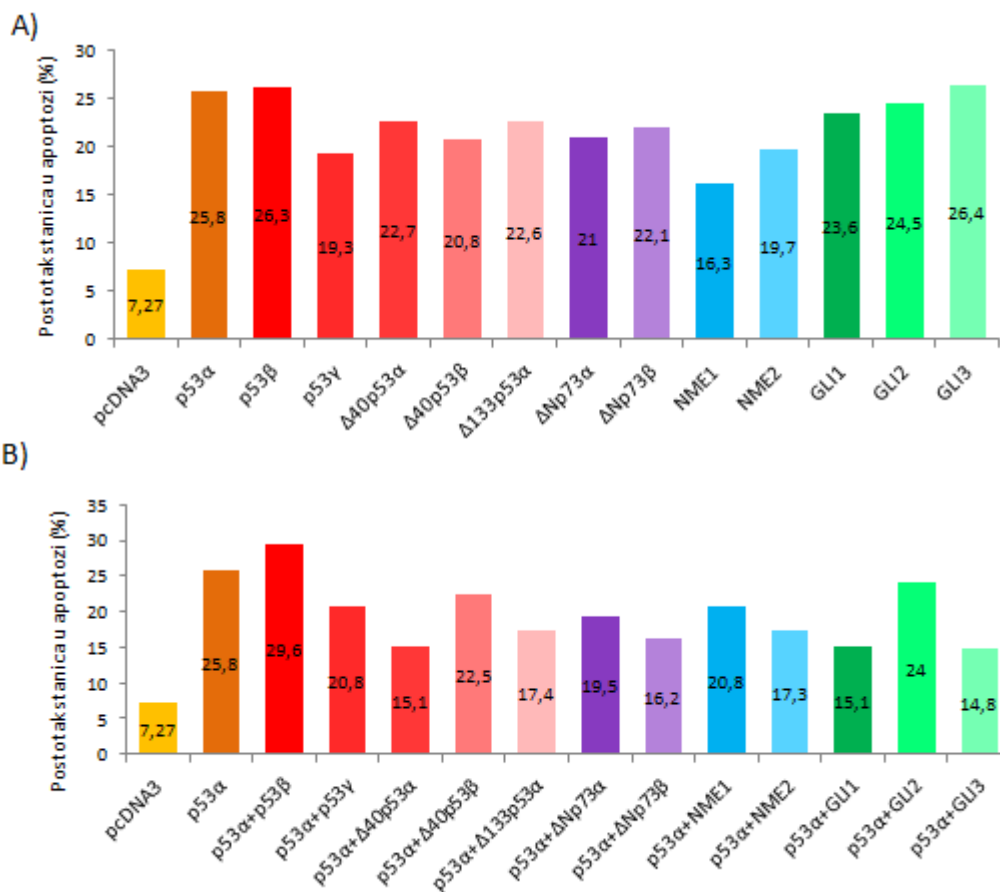


#### 4.8. Utjecaj proteina p53/p73, NME i GLI na apoptotsku aktivnost proteina p53 $\alpha$

Kako bi utvrdili utječu li proteini od interesa na apoptotsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  mjerili smo apoptozu na protočnom citometru. Staničnu liniju A375M izlagali smo rastućim koncentracijama kamptotecina (10, 20, 50, 100 i 500 nM) kako bi odredili koju ćemo količinu kamptotecina koristiti da bi potakli apoptozu. Titracijom smo odredili da je 20 nM kamptotecina idealna količina za poticanje rane apoptoze.

Kako bi utvrdili utjecaj izoformi proteina p53 i p73 koje tvore komplekse s proteinom p53 $\alpha$ , te proteina obitelji NME i GLI na apoptotsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ , staničnu liniju A375M prolazno smo transficirali plazmidima od interesa, samima i u kombinaciji s p53 $\alpha$  u množinskom omjeru 1:5. Rezultati pokazuju kako je apoptotska aktivnost smanjena u prisutnosti svih proučavanih proteina zasebno ali s različitim učinkom (slika 64 A).

Rezultati kotransfekcije pokazuju povećanje apoptoze u prisutnosti izoforme p53 $\beta$  za 14,7%, dok je smanjenje apoptoze pokazano u prisutnosti izoformi p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$  i  $\Delta$ 133p53 $\alpha$  za 19,4%, 41,4%, 12,8% i 32,6%. Smanjenje apoptoze pokazano je u prisutnosti izoformi proteina p73 –  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$ , te u prisutnosti proteina NME1, NME2, GLI1, GLI2 i GLI3 za 24,1%, 37,2%, 19,4%, 32,9%, 41,5%, 6,9% i 42,6% (slika 64 B).



**Slika 64: Utjecaj izoformi p53/p73, te proteina NME i GLI na apoptotsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ .** Lizate stanica A375M prolazno smo transficirali ekspresijskim vektorima p53 $\alpha$ , p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\beta$ , NME1, NME2, GLI1, GLI2 i GLI3 u množinskom omjeru 1:5. Dvadeset i četiri sata kasnije stanicama smo dodali 20 nM kamptotecina, te smo 24h kasnije mjerili apoptotsku aktivnost. Rezultati pokazuju da sami proteini smanjuju apoptotsku aktivnost, dok su rezultati kotransfekcije pokazali da jedino izoforma p53 $\beta$  povećava apoptozu u stanicama.

## 5. RASPRAVA

Protein p53 ima veoma složenu ulogu u održavanju genetske stabilnosti u stanici. Kao tumor-supresorski protein prisutan je u stanicama u bazalnoj razini te kontrolira stanični odgovor na stres (Kastan i sur., 1992). Pod utjecajem stresa, uzrokovanog ultraljubičastim ili ionizirajućim zračenjem, hipoksijom, oksidativnim stresom ili kemijskim agensima, njegova se razina u stanici povećava. Ovisno o intenzitetu i vrsti nastalog oštećenja određuje sudbinu stanice zaustavljajući stanični ciklus, sudjelujući u popravku DNA i, po potrebi, potičući programiranu staničnu smrt (apoptozu) ili stanično starenje (senescenciju), sprečavajući tako nastanak tumora (Vousden i Lane, 2007; Lane i Levine, 2010).

U tumorima ljudi protein p53 jedan je od najčešće mutiranih proteina sa stopom mutacija većom od 50%. Mutirani p53 ne obavlja ulogu tumorskog supresora, već naprotiv, može steći onkogeni potencijal, potičući stanice na ubrzanu diobu. Međutim, u melanomu je situacija drugačija, stopa mutacija proteina p53 je izuzetno niska (oko 10%). Usprkos tome protein p53 nije u mogućnosti obavljati svoju ulogu tumorskog supresora i spriječiti nastanak i rast tumora (Terzian i sur., 2010). Upravo zbog toga, u ovoj doktorskoj disertaciji istražujemo što to u metastatskom melanomu sprečava divlji tip proteina p53 da obavlja svoje funkcije.

Da bi bolje razumjeli melanom, odnosno metastatski melanom, trebamo razumjeti biologiju njegovog nastanka. Melanom nastaje kao posljedica maligne transformacije stanica melanocita uslijed izlaganja kože štetnom ultraljubičastom zračenju (Perlis i Herlyn, 2004). Kao što je poznato, UV-zračenje izaziva oštećenja u molekuli DNA, i to prvenstveno nastajanje ciklobutanskih pirimidinskih dimera te 6-4 fotoprodukata, a manjim dijelom lomove (Perlis i Herlyn, 2004). Stanice melanocita, a tako i stanice melanoma koje iz njih nastaju, imaju izuzetno dobro razvijene mehanizme popravka nastalih oštećenja (Sinha i Häder, 2002; Jhappan i sur., 2003). Ti mehanizmi, ujedno su i kamen spoticanja prilikom liječenja melanoma čineći ih izuzetno radio- i kemorezistentnima (Jhappan i sur., 2003; Avery-Kiejda i sur., 2008). U prilog toj činjenici idu i naši rezultati. Naime, zračenjem staničnih linija metastatskog melanoma čovjeka (A375M i WM793B) dozama od 5 i 10 Gy nismo uspjeli potaknuti stanice u apoptozu/nekrozu, već naprotiv, stanice su se nakon izlaganja  $\gamma$ -zračenju pojačano dijelile u odnosu na netretirane stanice. S druge strane, protutumorski lijekovi etopozid i cisplatin imali su citotoksično djelovanje na stanice i u dozi

IC<sub>50</sub> uspjeli su potaknuti stanice prema apoptozi/nekrozi. Na temelju ovih rezultata pretpostavili smo da u metastatskom melanomu postoje mehanizmi koji otežavaju proteinu p53 da obavlja svoje funkcije.

Satyamoorthy i suradnici (2000) istraživali su jesu li signalni putevi uzvodno ili nizvodno od p53 inaktivirani u metastatskom melanomu. Njihovi rezultati pokazali su da nakon izlaganja stanica genotoksičnom stresu dolazi do djelomične akumulacije proteina p53 sugerirajući time da je signalni put uzvodno od p53 djelomično aktivan. Međutim, navedeni stres nije uspio potaknuti zastoj staničnog ciklusa i apoptozu predlažući time da su signalni putevi nizvodno od p53 oštećeni.

Do sada je predloženo nekoliko mehanizama kojima bi se mogla objasniti funkcionalna inaktivacija proteina p53 u metastatskom melanomu. Naime, u metastatskom melanomu signalni put RAS-RAF-MEK-ERK konstantno je aktivan uslijed mutacija u kinazi BRAF. Ovaj signalni put, zadužen za proliferaciju, diferencijaciju i angiogenezu potiče ujedno i pojačanu ekspresiju proteina MDM2 (Polsky i sur., 2001; Berger i sur., 2004; Terzian i sur., 2010), te GLI1 (Stecca i Ruiz i Altaba, 2009). Protein MDM2, negativni regulator p53, sprečava nakupljanje i stabilizaciju proteina p53 (Polsky i sur., 2001; Berger i sur., 2004; Terzian i sur., 2010), dok protein GLI1 aktivira transkripciju proteina iASPP koji, stvarajući kompleks s proteinom p53, inhibira njegovu transkripcijsku aktivnost (Pandolfi i sur., 2015).

Drugi mehanizam govori o formiranju inhibitornih kompleksa unutar obitelji proteina p53 koji sprečavaju protein p53 da obavlja svoje funkcije u metastatskom melanomu. Izoforme proteina p53 ( $\Delta 40p53\alpha$  i  $p53\beta$ ), te proteina p63 ( $\Delta Np63\beta$ ) pojačano su eksprimirane u metastatskom melanomu i pogoduju stvaranju kompleksa  $\Delta 40p53\alpha/p53\alpha$  (Avery-Kiejda i sur., 2008; Takahashi i sur., 2014),  $p53\beta/p53\alpha$  (Avery-Kiejda i sur., 2008), te  $\Delta Np63\beta/p53\alpha$  (Matin i sur., 2013) koji inhibiraju transkripcijsku aktivnost proteina p53.

U ovoj doktorskoj disertaciji istražujemo još neke potencijalne direktne i indirektne inhibitore proteina p53, kao što su izoforme p53 i p73, proteini obitelji NME (NME1 i NME2), te proteini obitelji GLI (GLI1, GLI2 i GLI3).

## 5.1. Utjecaj izoformi p53 malih molekulskih masa na protein p53 u metastatskom melanomu

Gen *TP53* kodira za 12 izoformi proteina p53 koje, ovisno u tipu stanica i vrsti stresa, moduliraju stanični odgovor na stres (Joruiz i Bourdon, 2016). Do danas nije provedena detaljnija studija o ekspresiji i utjecaju izoformi p53 u metastatskom melanomu. Upravo zbog toga istraživali smo ekspresiju različitih izoformi proteina p53 u panelu od osam staničnih linija melanoma čovjeka, te u 36 uzoraka tkiva metastatskog melanoma čovjeka i pripadajućeg zdravog tkiva (kože). Našli smo da su izoforme p53 eksprimirane i u staničnim linijama i u tkivima metastatskog melanoma na genskoj i na proteinskoj razini. Uočili smo da ekspresija izoformi u tkivima prati ekspresiju izoformi u staničnim linijama, s p53 $\alpha$  izoformom kao najzastupljenijom, nakon čega slijede p53 $\beta$  i  $\Delta 40p53\alpha$ . Avery-Kiejda i suradnici (2008) također su pokazali koristeći semi-kvantitativni PCR da su izoforme p53 $\beta$  i  $\Delta 40p53\alpha$  najviše eksprimirane izoforme, ali i da su jače eksprimirane u odnosu na p53 $\alpha$  u staničnim linijama melanoma čovjeka. Međutim, mi smo koristili metodu *nested*-qPCR kojom smo vrlo precizno mogli odrediti ekspresiju pojedine izoforme. Nadalje, uočili smo da su mRNA varijante  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$  statistički značajno slabije eksprimirane u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo. Metodom *nested*-qPCR odredili smo prisutnost pojedine molekule mRNA, no prisutnost svih poznatih izoformi proteina moguće je, zbog različitog mjesta početka translacije, odrediti jedino na proteinskoj razini metodom SDS-PAGE i Western blot. Da bi to napravili što preciznije koristili smo standarde p53, specifična protutijela koja prepoznaju određeni set izoformi, te siRNA. Navedene tehnike pomogle su nam da precizno odredimo prisutnost pojedinih izoformi proteina p53. Našli smo da su proteinske izoforme  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$  statistički značajno jače eksprimirane u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo. Ove nedosljednosti između genske i proteinske ekspresije nisu neuobičajene. Naime, dogma „jedan gen - jedan protein“ u današnje vrijeme ne vrijedi jer otprilike 98% gena ima mogućnost alternativnog prekrajanja i sadrži različita mjesta početka translacije. Gen *TP53* nije izuzetak, on kodira 9 molekula mRNA koje su rezultat korištenja dva promotora (P1 i P2), te alternativnog prekrajanja u intronu 2 i intronu 9. Devet mRNA molekula, zbog alternativnih mjesta početka translacije (ATG1, ATG40, ATG133, ATG160), kodiraju ukupno 12 različitih proteinskih izoformi (Joruiz i Bourdon, 2016).

S obzirom da je metastatski melanom izuzetno radio- i kemorezistentan (Jhappan i sur., 2003; Avery-Kiejda i sur., 2008) provjerili smo da li se uslijed genotoksičnog stresa mijenja ekspresija izoformi proteina p53. Genotoksični stres potakli smo  $\gamma$ -zračenjem (5 i 10 Gy), te protutumorskim lijekovima etopozidom i cisplatinom ( $IC_{50} = 1 \mu M$ ). Naši rezultati pokazali su da se ekspresija izoformi p53 ne mijenja kao odgovor na genotoksični stres izazivan zračenjem niti u jednoj od dvije testirane stanične linije (A375M i WM793B). Međutim, genotoksični stres izazivan protutumorskim lijekovima povećao je ekspresiju proteina p53 $\alpha$  (kanonskog p53) u obje stanične linije, dok na izoforme p53 nije imao utjecaja. Ovi rezultati sugeriraju da je metastatski melanom više radio- nego kemorezistentan.

Budući da izoforme p53 moduliraju transkripcijsku aktivnost proteina p53 ovisno o vrsti stanica (Bourdon i sur., 2005; Joruz i Bourdon, 2016), odredili smo potencijalne interakcijske partnere proteina p53 $\alpha$  u stanicama melanoma te istražili na koji način moduliraju njegovu funkciju. Metodom ko-imunoprecipitacije našli smo (u endogenim uvjetima) komplekse između p53 $\alpha$  i p53 $\beta$ ; p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$ ; p53 $\alpha$  i  $\Delta 40p53\alpha$ , p53 $\alpha$  i  $\Delta 40p53\beta$ , te između p53 $\alpha$  i  $\Delta 133p53\alpha$ . Interakcije između p53 $\alpha$  i p53 $\beta$ ; p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$ ; p53 $\alpha$  i  $\Delta 40p53\alpha$ , te između p53 $\alpha$  i  $\Delta 133p53\alpha$  već su otprije poznate u literaturi (Bourdon i sur., 2005; Fujita i sur., 2009; Marcel i sur., 2014; Aoubala i sur., 2011, Hafsi i sur., 2013). Međutim, mi smo pronašli novu, do sada neobjavljenu, interakciju između p53 $\alpha$  i  $\Delta 40p53\beta$ .

Nadalje, istražili smo utjecaj ovih izoformi na transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$ , transficirajući rastuće količine izoformi s konstantnom količinom p53 $\alpha$  koja je iznosila 50% maksimalne aktivnosti u staničnoj liniji A375M. Rezultati luciferaznog testa pokazali su da izoforme p53 smanjuju transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$ , no s različitim učinkom. Povećanjem količine izoformi p53 $\beta$  i  $\Delta 40p53\beta$  dolazi do sve većeg smanjenja transkripcijske aktivnosti proteina p53 $\alpha$  (za 10%, 20% i 30%), dok se s povećanjem količine izoformi p53 $\gamma$  i  $\Delta 40p53\alpha$  transkripcijska aktivnost proteina p53 $\alpha$  smanjila za svega 15% i 25%. S druge strane, izoforma  $\Delta 133p53\alpha$ , kao jaki inhibitor, dokida transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  za 70% i 90%. Ovi rezultati pokazuju da izoforme p53 uistinu imaju utjecaj na transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  u metastatskom melanomu. Naime, iz literature je poznato da p53 $\beta$  mijenja transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  sjedajući prvenstveno na promotorske regije gena *p21* i *bax* potičući tako zastoj staničnog ciklusa i apoptozu u stanicama raka dojke (Bourdon i sur., 2005; Marcel i sur., 2014), dok u fibroblastima potiču senescenciju (Fujita i sur., 2009). Avery-Kiejda i suradnici (2008) pokazali su da u stanicama metastatskog melanoma p53 $\beta$

također mijenja transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  sjedajući na promotore gena *p21* i *PUMA*, potičući također njihovu transkripciju te zastoj staničnog ciklusa i apoptozu, dok su Marcel i suradnici (2014) pokazali da p53 $\gamma$  modulira transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  aktivirajući promotor *bax* i potičući tako apoptozu u stanicama raka dojke. Nadalje, Avery-Kiejda i suradnici (2008) pokazali su da u stanicama melanoma Mel-RM  $\Delta 40p53\alpha$  modulira transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  inhibirajući zastoj staničnog ciklusa i apoptozu, a Hafsi i suradnici (2013) da  $\Delta 40p53\alpha$  smanjuje transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  u stanica karcinoma pluća (H1299). Aoubala i suradnici (2011) su u nekoliko staničnih linija raka dojke pokazali da  $\Delta 133p53\alpha$  smanjuje transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  inhibirajući apoptozu i zastoj u fazi G1 staničnog ciklusa. I mi smo analizirali utjecaj izoformi p53 na poticanje apoptoze. Rezultati pokazuju da je postotak apoptotskih stanica porastao za 14,7% kada su stanice bile kotransficirane s p53 $\alpha$  i p53 $\beta$  za razliku od stanica transficiranih samo s p53 $\alpha$ . Nadalje, postotak apoptotskih stanica smanjio se, redom, za 19,4%, 41,5%, 12,8% i 32,6% kod stanica kotransficiranih s p53 $\alpha$  i p53 $\gamma$ ; p53 $\alpha$  i  $\Delta 40p53\alpha$ , p53 $\alpha$  i  $\Delta 40p53\beta$ , te p53 $\alpha$  i  $\Delta 133p53\alpha$  za razliku od stanica transficiranih samo s p53 $\alpha$ . Ovi rezultati potvrđuju da p53 $\beta$  izoforma potiče apoptozu u melanomskim staničnim linijama doprinoseći tako njihovoj osjetljivosti, dok izoforme p53 $\gamma$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 133p53\alpha$  inhibirajući apoptozu u melanomskim staničnim linijama doprinose njihovoj otpornosti.

Naši rezultati slažu se s rezultatima Bourdon i suradnika (2005), koji su, kao i Avery-Kiejda i suradnici (2008) pokazali da izoforma p53 $\beta$  potiče stanice na apoptozu. Bourdon i suradnici pokazali su to u stanicama raka dojke, dok su Avery-Kiejda i suradnici to potvrdili na metastatskom melanomu. Nadalje, pokazalo se da izoforme  $\Delta 40p53\alpha$  i  $\Delta 133p53\alpha$  inhibiraju apoptozu, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Avery-Kiejda i suradnici (2008), odnosno Aoubala i suradnici (2011). Avery-Kiejda i suradnici pokazali su na stanicama metastatskog melanoma da  $\Delta 40p53\alpha$  inhibira apoptozu, dok su Aoubala i suradnici (2011) pokazali su da  $\Delta 133p53\alpha$  inhibira apoptozu u stanicama raka dojke. Nadalje, naši rezultati koji pokazuju da p53 $\gamma$  inhibira apoptozu u metastatskom melanomu nisu u skladu s rezultatima Marcel i suradnici (2014) koji su pokazali da izoforma p53 $\gamma$  potiče apoptozu u stanicama raka dojke.

## 5.2. Utjecaj izoformi proteina p73 na protein p53 u metastatskom melanomu

Gen *TP73* kodira za mnogobrojne izoforme proteina p73. Zbog visoke homologije između p53 i p73, izoforme p73 imaju sposobnost prepoznavanja i vezanja na kanonske elemente koje prepoznaje protein p53. Nadalje, izoforme p73 imaju i mogućnost stvaranja heterotetramera s proteinom p53 (Moll i Slade, 2004; Zaika i sur., 2002). Sve navedeno utječe na stanični odgovor proteina p53.

Detaljnija studija ekspresije i utjecaja izoformi p73 u metastatskom melanomu nije provedena. Tuve i suradnici (2004) proveli su istraživanja genske ekspresije izoformi p73 u melanomu i pronašli su povećanu ekspresiju izoformi TAp73, Ex2p73 and Ex2/3p73 u metastazama, dok su u benignom nevasu pronašli povećanu ekspresiju izoformi  $\Delta$ Np73. Naša istraživanja pokazala su da su izoforme p73 eksprimirane i u staničnim linijama i u tkivima metastatskog melanoma na genskoj i na proteinskoj razini, te da ekspresija izoformi u tkivima prati ekspresiju izoformi u staničnim linijama. Uočili smo da su obje varijante mRNA, TAp73 i  $\Delta$ Np73, statistički značajno slabije eksprimirane u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo. Također, našli smo da je protein  $\Delta$ Np73 $\alpha$  statistički značajno jače eksprimiran u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo. Ove nedosljednosti između genske i proteinske ekspresije nisu neuobičajene posebice zbog pristupa koji smo koristili. Naime, u analizi genske ekspresije određivali smo sveukupne izoforme TAp73 i  $\Delta$ Np73, dok smo u analizi proteinske ekspresije mogli odrediti pojedinačne izoforme. Dakle, najprikladnija metoda za određivanje specifičnih izoformi p73 je SDS-PAGE i Western blot.

Poznato je da se količina izoformi p73, isto kao i p53 povećava u odgovoru na genotoksične agense (Irwin i sur. 2003; Marabese i sur., 2003; Stanelle i Pützer, 2006; Gong i sur., 2018), te smo određivali njihovu ekspresiju nakon izlaganja stanica  $\gamma$ -zračenju i kemijskim agensima.

Naši rezultati pokazali su da se ekspresija izoformi p73, kao i p53, ne mijenja kao odgovor na  $\gamma$ -zračenje (doze 5 i 10 Gy) niti u jednoj od dvije testirane stanične linije (A375M i WM793B). S druge strane, rezultati doktorske disertacije Anđele Horvat (Horvat, 2015) pokazali su kako se količina izoformi p73 uslijed izlaganja  $\gamma$ -zračenju povećava u fibroblastima i stanicama osteosarkoma čovjeka. Gong i suradnici (2018) također su pokazali



da se količina izoformi TAp73, za razliku od izoformi  $\Delta Np73$ , povećava uslijed izlaganja  $\gamma$ -zračenju u stanicama raka debelog crijeva. Nadalje, protutumorski lijekovi (cispatina i etopozid) povećali su ekspresiju svih izoformi proteina p73 u obje stanične linije. Naši rezultati su u suglasnosti s rezultatima koja su dobili Irwin i suradnici (2003), te Marabese i suradnici (2003) a koji pokazuju kako mnogobrojni protutumorski lijekovi povećavaju ekspresiju izoformi TAp73 u stanicama raka debelog crijeva, neuroblastoma, glioblastoma i osteosarkoma čovjeka, te da su izoforme p73 odgovorne za otpornost stanica na protutumorske lijekove.

Budući da izoforme p73 utječu na transkripcijsku aktivnost proteina p53 (Stiewe i sur., 2002a; Zaika i sur., 2002), istražili smo interakcije između izoformi proteina p73 i p53 $\alpha$  u stanicama metastatskog melanoma te ispitali na koji način reguliraju njegovu ulogu. Metodom ko-immunoprecipitacije našli smo komplekse između p53 $\alpha$  i  $\Delta Np73\alpha$ , te između p53 $\alpha$  i  $\Delta Np73\beta$  u endogenim uvjetima, i između p53 $\alpha$  i TAp73 $\alpha$ ; te između p53 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  u uvjetima ektopično eksprimiranog proteina p53 $\alpha$ .

Interakcije između izoformi  $\Delta Np73$  i p53 divljeg tipa već su otprije poznate u literaturi (Stiewe i sur., 2002b; Zaika i sur., 2002), dok su interakcije između izoformi TAp73 i p53 pokazane samo u slučaju mutiranog p53 proteina (Zorić, 2009; Di Como i sur., 1999; Strano i sur., 2000; Marin i sur., 2000; Gaiddon i sur., 2001). Međutim, postoje naznake da interakcije između izoformi TAp73 i p53 divljeg tipa ipak postoje. Kaghad i suradnici (1997) pokazali su postojanje slabe interakcije između TAp73 i p53 divljeg tipa metodom dvostrukog kvašćevog hibrida (od engl. *yeast two-hybrid system*), dok su Chen i suradnici (2014) također naveli mogućnost postojanja kompleksa između izoformi TAp73 i p53 divljeg tipa. Dok je postojanje kompleksa između izoformi TAp73 i p53 divljeg tipa i dalje upitno, postojanje izravnih proteinskih interakcija između izoformi TAp73 i izoformi p53 potvrdili su Zorić i suradnici (2013), te Gong i suradnici (2018).

Kako bi istražili učinak izoformi p73 na transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$ , kotransficirali smo stanice A375M, kao i kod analize izoformi p53, rastućim količinama izoformi p73 zajedno s konstantnom količinom p53 $\alpha$ . Rezultati koje smo dobili pokazali su da obje izoforme,  $\Delta Np73\alpha$  i  $\Delta Np73\beta$ , u potpunosti inhibiraju transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  u metastatskom melanomu, što je u skladu s podacima iz literature koji pokazuju da su izoforme  $\Delta N$  jaki inhibitori divljeg tipa p53 (Stiewe i sur., 2002b; Zaika i sur., 2002). Stiewe i suradnici (2002b) pokazali su da je  $\Delta Np73\alpha$  jači inhibitor od  $\Delta Np73\beta$ .

Također, analizirali smo utjecaj izoformi p73 na poticanje apoptoze u stanicama metastatskog melanoma. Rezultati koje smo dobili pokazali su da se postotak apoptotskih stanica smanjio se za 24,1% i 37,2%, kod stanica kotransficiranih s p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ ; odnosno p53 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$ , u usporedbi sa stanicama transficiranim samo s p53 $\alpha$ . Ovi rezultati sugeriraju da izoforme  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$  inhibirajući apoptozu u melanomskim staničnim linijama doprinose njihovoj otpornosti što je u skladu sa rezultatima koje su pokazali Stiewe i suradnici (2002b), te Zaika i suradnici (2002).

### **5.3. Utjecaj proteina NME1 i NME2 na protein p53 u metastatskom melanomu**

Gen nm23-H1 (NME) identificirala je Patricia S. Steeg i suradnici (Steeg i sur., 1988) na staničnim linijama mišjeg melanoma K1735 različitog metastatskog potencijala. U tim pokusima je pokazano da je razina mRNA obrnuto proporcionalna metastatskom potencijalu ispitivanih stanica, stoga je nazvan supresorom metastaziranja. U metastatskom melanomu predložen je kao prediktivni prognostički parametar preživljenja (Xerri i sur., 1994). Jung i suradnici (2007) pokazali su da postoje direktne proteinske interakcije između NME1 i p53 koje moduliraju odgovor proteina p53. Naime, NME1 ometa interakciju između MDM2 i p53 poboljšavajući time transkripcijsku aktivnost proteina p53, i omogućavajući zastoj staničnog ciklusa i apoptozu. Upravo zbog toga ispitali smo ekspresiju i utjecaj NME1 i njegovog homologa NME2 na aktivnost p53 u metastatskom melanomu čovjeka.

Za istraživanje ekspresije gena/proteina NME1 i NME2 koristili smo, kao i u prijašnjim analizama, panel staničnih linija i tkiva metastatskog melanoma čovjeka. Naša istraživanja pokazala su da su NME1 i NME2 eksprimirani i u staničnim linijama i u tkivima metastatskog melanoma na genskoj i na proteinskoj razini, te da njihova ekspresija u tkivima prati ekspresiju u staničnim linijama. Nadalje, uočili smo da ne postoji statistički značajna razlika u ekspresiji gena *NME1* i *NME2* između tkiva metastatskog melanoma i zdravog tkiva. Slične podatke pokazali su Hamby i suradnici (1995), te Easty i suradnici (1996). Međutim, uočili smo da su proteini NME1 i NME2 statistički značajno jače eksprimirani u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo. Naši rezultati su u suprotnosti s većinom dosadašnjih rezultata koji govore da je NME1 supresor metastaziranja u metastatskom melanomu. Ipak, Hamby i suradnici (1995), te Easty i suradnici (1996) pokazali su rezultate

slične našima. Jedno od mogućih objašnjenja ovih nedosljednosti je heterogenost tumora koji su zapravo mješavina stanica s različitom ekspresijom proteina NME. Naime, Martinez i suradnici (1995) pokazali su imunohistokemijskim analizama da je ekspresija proteina NME1 manja na invazivnoj strani tumora, u odnosu na ostatak tumorske mase.

S obzirom da smo pokazali kako se uslijed genotoksičnog stresa ekspresija izoformi p53 i p73 selektivno mijenja, zanimalo nas je odgovaraju li proteini NME1 i NME2 na stres. Naši rezultati pokazali su da se ekspresija proteina NME1 i NME2 ne mijenja kao odgovor na stres izazvan  $\gamma$ -zračenjem (doze 5 i 10 Gy) u nijednoj od dvije testirane stanične linije (A375M i WM793B). Međutim, stres izazivan protutumorskim lijekovima (cisplatinom i etopozidom) povećao je ekspresiju oba proteina u obje testirane stanične linije. Ovi rezultati, kao i prijašnji, sugeriraju da najvjerojatnije postoji očuvani obrazac odgovora metastatskog melanoma na genotoksične agense.

Budući da su Jung i suradnici (2007) pokazali da protein NME1 može modulirati transkripcijsku aktivnost proteina p53 istražili smo u stanicama metastatskog melanoma da li postoji interakcija s proteinom p53 $\alpha$  te ispitali utječe li na njegovu funkciju. Međutim, metodom ko-immunoprecipitacije u endogenim uvjetima, te u uvjetima ektopično eksprimiranog proteina p53 $\alpha$  nismo našli komplekse između proteina NME1 odnosno NME2 i proteina p53 $\alpha$ , za razliku od Jung i suradnika (2007) koji su pokazali direktnu proteinsku interakciju između proteina NME1 i p53. Za sada nema drugog podatka u literaturi koji bi potvrdio njihovu direktnu povezanost.

Nadalje, iako NME1 i NME2 nisu stvorili komplekse s p53 $\alpha$ , zanimalo nas je mogu li ovi proteini, koji ujedno imaju i ulogu transkripcijskog faktora (Bosnar i sur., 2009), poticati transkripciju p53-ciljnih gena, te mogu li regulirati transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  u stanicama metastatskog melanoma. Mjereći transkripcijsku aktivnost, našli smo da NME1 i NME2 mogu poticati transkripciju p53-ciljnih gena, ali znatno slabije nego p53. Slične rezultate pokazali su Jung i suradnici (2007). Oni su našli da NME1, osim što može poticati transkripciju p53-ciljnih gena (*p21* i *Bax*), ujedno potiče i transkripciju gena *TP53*.

Da bi istražili utjecaj proteina NME1 i NME2 na transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$ , transficirali smo, kao i u prijašnjim pokusima, rastuće količine NME1 i NME2 s konstantnom količinom p53 $\alpha$ . Rezultati su pokazali da proteini NME1 i NME2 blago povećavaju transkripcijsku aktivnost proteina p53 $\alpha$  u metastatskom melanomu za 30%. Naši rezultati

djelomično se slažu s rezultatima koje su dobili Jung i suradnici (2007) a koji pokazuju da protein NME1 pojačava transkripcijsku aktivnost proteina p53.

Analizirali smo također i utjecaj proteina NME1 i NME2 na poticanje stanica metastatskog melanoma u apoptozu te pokazali da je postotak apoptotskih stanica smanjen za 19,4% i 32,9% kada su stanice bile kotransficirane s p53 $\alpha$  i NME1, odnosno p53 $\alpha$  i NME2 u odnosu na stanice transficirane samo s p53 $\alpha$ . Ovi rezultati sugeriraju da proteini NME1 i NME2 inhibirajući apoptozu u melanomskim staničnim linijama doprinose njihovoj otpornosti. Za razliku od nas, Jung i suradnici (2007) pokazali su da rastuće količine NME1 potiču sve jaču apoptozu.

#### **5.4. Utjecaj proteina GLI1, GLI2 i GLI3 na protein p53 u metastatskom melanomu**

Između proteina p53 i proteina obitelji GLI postoji mehanizam negativne povratne sprege. Naime, protein p53 inhibira ekspresiju proteina GLI1 i obratno, protein GLI1 inhibira ekspresiju proteina p53 (Abe i sur., 2008; Stecca i Ruiz i Altaba, 2009). Protein GLI2 pokazuje sličnu ovisnost. Ho i suradnici (2009) pokazali su da neki tumori pokazuju sinergistički efekt između gubitka proteina p53 i prekomjerne ekspresije proteina GLI2. Stoga smo ispitali ekspresiju proteina GLI1, GLI2 i GLI3 te njihov utjecaj na protein p53 u metastatskom melanomu čovjeka.

Za istraživanje ekspresije gena/proteina GLI1, GLI2 i GLI3 koristili smo, kao i u prijašnjim analizama panel staničnih linija i tkiva metastatskog melanoma čovjeka. Naša istraživanja pokazala su da su GLI1, GLI2 i GLI3 eksprimirani i u staničnim linijama i u tkivima metastatskog melanoma na genskoj i na proteinskoj razini, te da ekspresija GLI1, GLI2 i GLI3 u tkivima prati ekspresiju u staničnim linijama. Geni *GLI1* i *GLI2* statistički su značajno slabije eksprimirani u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo, dok su proteinske izoforme GLI1\_160, GLI1\_130 i GLI2\_133 statistički značajno jače eksprimirane u tkivima metastatskog melanoma u odnosu na zdravo tkivo. Kao i kod gena obitelji p53, nedosljednosti između genske i proteinske ekspresije nisu neuobičajene zbog složenosti strukture gena koja omogućuje sintezu više izoformi GLI. Naime, u analizi genske ekspresije određivali smo ekspresiju mRNA gena *GLI1*, *GLI2* i *GLI3*, dok smo u analizi proteinske ekspresije mogli odrediti pojedine izoforme. Gen *GLI1* kodira za 4 izoforme koje

nastaju alterantivnim prekrajanjem (Amable i sur., 2014), gen *GLI2* kodira mnogobrojne izoforme koje nastaju alterantivnim prekrajanjem od kojih je najzastupljenija *GLI2\_133* (Speek i sur., 2006), a proteini *GLI2* i *GLI3* imaju i mogućnost proteolitičkog cijepanja čime nastaju njihove represorske forme (Pan i sur., 2006).

Nadalje, ispitali smo da li proteini obitelji *GLI* odgovaraju na genotoksični stres. Naši rezultati pokazali su da se ekspresija proteina *GLI1* blago smanjuje kao odgovor na genotoksični stres izazivan  $\gamma$ -zračenjem (dozama 5 i 10 Gy) u staničnoj liniji A375M, dok u WM793B nismo našli promjene u ekspresiji. Ekspresija proteina *GLI2* blago se snizila u obje stanične linije u odgovoru na  $\gamma$ -zračenje, a ekspresija proteina *GLI3* nije se promjenila niti u jednoj od dvije ispitivane stanične linije. S druge strane, cispatina i etopozid su povećali ekspresiju izoformi *GLI3\_A* i *GLI3\_R* u obje stanične linije, a na ekspresiju ostalih proteina nisu imali utjecaja. Iz literature je poznato da proteini obitelji *GLI* reagiraju na genotoksični stres, ali rezultati nisu jednoznačni. Dok su Tsai i suradnici (2015) pokazali kako se količina proteina *GLI1* povećava uslijed  $\gamma$ -zračenja, Fan i suradnici (2017) pokazali su kako se njegova količina smanjuje uslijed djelovanja doksorubicina.

Budući da je poznato da između proteina *p53* i *GLI* postoji mehanizam negativne povratne sprege (Stecca i Ruiz i Altaba, 2009), ispitali smo mogu li proteini *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* utjecati na transkripcijsku aktivnost proteina *p53*. Metodom ko-imunoprecipitacije u endogenim uvjetima, te u uvjetima ektopično eksprimiranog proteina *p53 $\alpha$*  nismo našli komplekse proteina *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* s proteinom *p53*.

Iako *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* nisu tvorili komplekse s *p53 $\alpha$* , zanimalo nas je mogu li ovi proteini, koji su ujedno i transkripcijski faktori, poticati transkripciju *p53*-ciljnih gena. Zanimljivo, mjereći transkripcijsku aktivnost, našli smo da *GLI1* i *GLI2* mogu poticati transkripciju *p53*-ciljnih gena kao i *p53*, dok *GLI3* gotovo nema utjecaja.

Da bi istražili mogu li *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* utjecati na transkripcijsku aktivnost proteina *p53 $\alpha$*  u metastatskom melanomu, stanice smo transficirali rastućim količinama *GLI1*, *GLI2* i *GLI3* zajedno s konstantnom količinom *p53 $\alpha$* . Rezultati pokazuju da proteini *GLI1* i *GLI2* snažno povećavaju transkripcijsku aktivnost proteina *p53 $\alpha$*  u metastatskom melanomu, dok protein *GLI3* puno slabije. U prilog tome ide istraživanje Yoon i suradnika (2015) koji su pokazali kako između proteina *p53* i proteina obitelji *GLI* postoji kompeticija za TAF9 (od engl., *TATA binding protein associated factor 9*) koji pospješuje transkripcijsku aktivnost oba

proteina. Isto tako, pokazali su kako transaktivacijska domena proteina GLI1, GLI2 i GLI3 dijeli sličnost s transaktivacijskom domenom proteina p53, sugerirajući time na potencijalne regulacijske interakcije između ovih proteina.

Za kraj, analizirali smo utjecaj proteina GLI1, GLI2 i GLI3 u metastatskom melanomu na poticanje apoptoze. Rezultati koje smo dobili pokazali su da se postotak apoptotskih stanica snizio, za 41,5%, 6,9% i 42,6% kada su stanice bile kotransficirane s p53 $\alpha$  i GLI1, p53 $\alpha$  i GLI2, te p53 $\alpha$  i GLI3 za razliku od stanica transficiranih samo s p53 $\alpha$ . Ovi rezultati sugeriraju da proteini GLI1 i GLI3 inhibiraju apoptozu u melanomskim staničnim linijama doprinose njihovoj otpornosti.

Budući da protein p53 ima nisku stopu mutacija u metastatskom melanomu, pokušaj njegove aktivacije je zanimljiv i obećavajući pristup. Aktivacijom proteina p53 kombiniranom kemoterapijom moglo bi se poboljšati sveukupno preživljenje pacijenata.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Analiza ekspresije gena pokazala je sniženu ekspresiju izoformi  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$ , TAp73 i  $\Delta Np73$ , te gena *GLI1* i *GLI2* u tkivima metastatskog melanoma čovjeka u odnosu na kontrolno zdravo tkivo. Ekspresija gena u tkivima pratila je ekspresiju gena u staničnim linijama.
2. Analiza ekspresije proteina pokazala je povišenu ekspresiju izoformi  $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$ ,  $\Delta Np73\alpha$ , proteina NME1 i NME2, te izoformi GLI1\_160 kDa, GLI1\_130 kDa i GLI2\_133 kDa u tkivima metastatskog melanoma čovjeka u odnosu na kontrolno zdravo tkivo. Ekspresija proteina u tkivima pratila je ekspresiju proteina u staničnim linijama.
3. Stanične linije melanoma čovjeka izuzetno su otporne na terapiju. Tretman stanica  $\gamma$ -zračenjem (doze 5 i 10 Gy) nije izazvao apoptozu niti je potaknuo pojačanu ekspresiju proteina od interesa. S druge strane, tretmani protutumorskim lijekovima (cisplatinom i etopozidom) potaknuli su stanice da pojačano eksprimiraju proteine od interesa.
4. U stanicama metastatskog melanoma čovjeka pronašli smo komplekse proteina p53α s izoformama p53 niskih molekulskih masa (p53β, p53γ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 133p53\alpha$ ) i izoformama p73 (TAp73α, TAp73β,  $\Delta Np73\alpha$  i  $\Delta Np53\beta$ ). Kompleksi s proteinima obitelji NME i GLI nisu pronađeni.
5. Rezultati testa aktivnosti luciferaze pokazuju da izoforme p53 i p73, te protein GLI3 smanjuju transkripcijsku aktivnost proteina p53α, ali u različitim postotcima. Proteini NME1 i NME2 blago povećavaju, dok proteini GLI1 i GLI2 snažno povećavaju transkripcijsku aktivnost proteina p53α.
6. Analizom apoptoze na protočnom citometru pokazali smo da sve izoforme, osim p53β, te svi ostali ispitivani protein smanjuju apoptotsku aktivnost proteina p53α s različitim učinkom. S druge strane izoforma p53β, pojačava apoptotsku aktivnost proteina p53α.

## 7. LITERATURA

1. Abe Y, Oda-Sato E, Tobiume K, Kawauchi K, Taya Y, Okamoto K, Oren M, Tanaka N (2008). „Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2“. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(12):4838-4843
2. Amable L, Gavin E, Kudo K, Meng E, Rocconi R, Shevde L, Reed E (2014). „GLI1 upregulates C-JUN through a specific 130-kDa isoform“. *Int J Oncol*. 44(3):655-661
3. Aoubala M, Murray-Zmijewski F, Khoury MP, Fernandes K, Perrier S, Bernard H, Prats AC, Lane DP, Bourdon JC (2011). „P53 directly transactivates  $\Delta 133p53\alpha$ , regulating cell fate outcome in response to DNA damage“. *Cell Death Differ*. 18(2):248-258
4. Avery-Kiejda KA, Xu DZ, Adams LJ, Scott RJ, Vojtesek B, Lane DP, Hersey P (2008). „Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin“. *Clin Cancer Res*. 14(6):1659-1668
5. Belter B, Haase-Kohn C, Pietzsch J (2017). „Biomarkers in Malignant Melanoma: Recent Trends and Critical Perspective“. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. CHAPTER 3
6. Bénard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC (2003). „TP53 family members and human cancers“. *Hum Mutat*. 21(3):182-191
7. Berger AJ, Camp RL, DiVito KA, Kluger HM, Halaban R, Rimm DL (2004). „Automated quantitative analysis of HDM2 expression in malignant melanoma shows association with early-stage disease and improved outcome“. *Cancer Res*. 64(23):8767-8772
8. Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, Van Den Berghe L, Peurichard A, Javerzat S, Bikfalvi A, Lane DP, Bourdon JC, Prats AC (2013). „The p53 isoform,  $\Delta 133p53\alpha$  stimulates angiogenesis and tumour progression“. *Oncogene*. 32(17):2150-2160
9. Bosnar MH, Bago R, Četković H (2009). „Subcellular localization of Nm23/NDPK A and



- B isoforms: A reflection of their biological function?" *Mol Cell Biochem.* 329(1-2):63-71
10. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP (2005). „p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity“. *Genes Dev.* 19(18): 2122–37.
  11. Carpenter RL, Lo HW (2012). „Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer“. *Discov Med.* 13(69):105-113
  12. Cervoni L, Egistelli L, Eufemi M, D'Abusco AS, Altieri F, Lascu I, Turano C, Giartosio A (2006). „DNA sequences acting as binding sites for NM23/NDPK proteins in melanoma M14 cells“. *J Cell Biochem.* 98(2):421-428
  13. Chen SL, Wu YS, Shieh HY, Yen CC, Shen JJ, Lin KH (2003). „p53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1“. *Mol Carcinog.* 36(4):204-214
  14. Chen D, Ming L, Zou F, Peng Y, Van Houten B, Yu J, Zhang L (2014). „TAp73 promotes cell survival upon genotoxic stress by inhibiting p53 activity“. *Oncotarget.* 5(18):8107-8122
  15. De Laurenzi V, Catani MV, Terrinoni A, Corazzari M, Melino G, Costanzo A, Levrero M, Knight RA (1999). „Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta“. *Cell Death Differ.* 6(5):389-390
  16. De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, Melino G (1998). „Two New p73 Splice Variants,  $\gamma$  and  $\delta$ , with Different Transcriptional Activity“. *J Exp Med.* 188(9):1763-1768
  17. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ (1979). „Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse.“ *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(5):2420-2424

18. Desvignes T, Pontarotti P, Fauvel C, Bobe J (2009). „Nme protein family evolutionary history, a vertebrate perspective“. *BMC Evol Biol.* 9(1):256
19. Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C (1999). „p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells.“ *Mol Cell Biol.* 19:1438-1449
20. Easty DJ, Maung K, Lascu I, Véron M, Fallowfield ME, Hart IR, Bennett DC (1996). „Expression of NM23 in human melanoma progression and metastasis.“ *Br J Cancer.* 74(1):109-114
21. Egistelli L, Chichiarelli S, Gaucci E, Eufemi M, Schininà ME, Giorgi A, Lascu I, Turano C, Giartosio A, Cervoni L (2009). „IFI16 and NM23 bind to a common DNA fragment both in the P53 and the cMYC gene promoters“. *J Cell Biochem.* 106(4): 666-672
22. Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M (1984). „Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells“. *Nature.* 312(5995):646-649
23. Fan H, Li H, Liu G, Cong W, Zhao H, Cao W, Zheng J (2017). „Doxorubicin combined with low intensity ultrasound supresses the growth of oral squamous cell carcinoma in culture and in xenografts“. *J Exp Clin Cancer Res.* 36(163)
24. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989). „The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation“. *Cell.* 57(7):1083-1093
25. Flores ER, Tsai KY, Crowley D (2002). „p63 and p73 are required for p53- dependent apoptosis in response to DNA damage“. *Nature.* 416(6880):560-564
26. Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, Bowman ED, Mathe EA, Schetter AJ, Pine SR, Ji H, Vojtesek B, Bourdon JC, Lane DP, Harris CC (2009). „p53 isoforms  $\Delta 133p53$  and  $p53\beta$  are endogenous regulators of replicative cellular senescence“. *Nat Cell Biol.* 11(9):1135-1142
27. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C (2001). „A subset of tumor-derived

- mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain“. *Mol Cell Biol.* 21:(1874-1887)
28. Gong H, Zhang Y, Jiang K, Ye S, Chen S, Zhang Q, Peng J, Chen J (2018). „p73 coordinated with  $\Delta 133p53$  to promote DNA double-strand break repair“. *Cell Death Differ.* 25:1063-1079
29. Graupner V, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Jänicke RU (2009). „Functional characterization of p53 $\beta$  and p53 $\gamma$ , two isoforms of the tumor suppressor p53“. *Cell Cycle.* 8(8):1238-1248
30. Gressner O, Schilling T, Lorenz K, Schulze Schleithoff E, Koch A, Schulze-Bergkamen H, Lena AM, Candi E, Terrinoni A, Catani MV, Oren M, Melino G, Krammer PH, Stremmel W, Muller M (2005). „TAp63 $\alpha$  induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria“. *EMBO J.* 24(13):2458-2471
31. Guo X, Keyes WM, Papazoglu C, Zuber J, Li W, Lowe SW, Vogel H, Mills AA (2009). „TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo“. *Nat Cell Biol.* 11(12):1451-1457
32. Hafsi H, Santos-Silva D, Courtois-Cox S, Hainaut P (2013). „Effects of  $\Delta 40p53$ , an isoform of p53 lacking the N-terminus, on transactivation capacity of the tumor suppressor protein p53“. *BMC Cancer.* 13:134
33. Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgard R, Dean M, Wainwright B (1996). „A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities“. *J Biol Chem.* 271(21):12125-12128
34. Hamby CV, Mendola CE, Potla L, Stafford G, Backer JM (1995). „Differential expression and mutation of NME genes in autologous cultured human melanoma cells with different metastatic potentials“. *Biochem Biophys Res Commun.* 211(2):579-585

35. Hearing VJ (1999). „Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization“. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 4(1):24-28
36. Ho L, Stojanovski A, Whetstone H, Wei QX, Mau E, Wunder JS, Alman B (2009). „Gli2 and p53 Cooperate to Regulate IGFBP-3-Mediated Chondrocyte Apoptosis in the Progression from Benign to Malignant Cartilage Tumors“. *Cancer Cell.* 16(2):126-136
37. Horvat A (2015). „Utjecaj proteina  $\Delta Np73\alpha$  na kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA u stanicama čovjeka“. (Doktorska disertacija) Osijek
38. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG (2003). „Chemosensitivity linked to p73 function“. *Cancer Cell.* 3(4):403-410
39. Jenkins JR, Rudge K, Currie GA (1984). „Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53“. *Nature.* 312:651-654
40. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G (2003). „Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma“. *Oncogene.* 22(20): 3099-3112
41. Joerger AC, Wilcken R, Andreeva A (2014). „Tracing the evolution of the p53 tetramerization domain“. *Structure.* 22(9):1301-1310
42. Jorruiz SM, Bourdon JC (2016). „p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision“. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(8): a026039
43. Jung H, Seong HA, Ha H (2007). „NM23-H1 tumor suppressor and its interacting partner STRAP activate p53 function“. *J Biol Chem.* 282(48):35293-35307
44. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997). „Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers.“ *Cell.* 90(4):809-819

- 
45. Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr (1992). „A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia“. *Cell*. 71(4):587-597
46. Keyes WM, Wu Y, Vogel H, Guo X, Lowe SW, Mills AA (2005). „p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging“. *Genes Dev*. 19(17):1986-1999
47. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B (1987). „Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma“. *Science*. 236(4797):70-73
48. Kress M, May E, Cassingena R, May P (1979). „Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum.“ *J Virol*. 31(2):472-483
49. Lacombe MLL, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO (2000). „The human Nm23/Nucleoside diphosphate kinases“. *J Bioenerg Biomembr*. 32(3):247-258
50. Lane DP (1992). „Cancer. p53, guardian of the genome.“ *Nature*. 358(6381):15-16
51. Lane DP, Crawford LV (1979). „T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.“ *Nature*. 278:261-263
52. Lane DP, Levine A (2010). „p53 Research: the past thirty years and the next thirty years.“ *CSH Perspect Biol*. 2(12):a000893
53. Lee ML, Tomsu K, Von Eschen KB (2000). „Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis.“ *Melanoma res*. 10(1):81-92
54. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE (1996). „A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome“. *Nat Genet*. 12(1):85-87

- 
55. Levanat S, Čretnik M, Musani V (2008). „Hh-Gli signaling pathway functions and its therapeutic potential in cancer“. *Croat Chem Acta*. 81(1):1-5
56. Linzer DI, Levine AJ (1979). „Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells“. *Cell*. 17(1):43-52
57. Marabese M, Vikhanskaya F, Rainelli C, Sakai T, Broggini M (2003). „DNA damage induces transcriptional activation of p73 by removing C-EBP $\alpha$  repression on E2F1“. *Cell*. 31(22):6624-6632
58. Marcel V, Fernandes K, Terrier O, Lane DP, Bourdon JC (2014). „Modulation of p53 $\beta$  and p53 $\gamma$  expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response“. *Cell Death Differ*. 21(9):1377-1387
59. Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA, James N, McGregor JM, Harwood CA, Yulug IG, Vousden KH, Allday MJ, Gusterson B, Ikawa S, Hinds PW, Crook T, Kaelin Jr WG (2000). „A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour“. *Nat Genet*. 25:47-54
60. Martinez JA, Prevot S, Nordlinger B, Nguyen TM, Lacarriere Y, Munier A, Lascu I, Vaillant JC, Capeau J, Lacombe ML (1995). „Overexpression of nm23-H1 and nm23-H2 genes in colorectal carcinomas and loss of nm23-H1 expression in advanced tumour stages“. *Gut*. 37(5):12-20
61. Matin RN, Chikh A, Chong LS, Mesher D, Graf M, Sanza P, Senatore V, Scatolini M, Moretti F, Leigh IM, Proby CM, Costanzo A, Chiorino G, Cerio R, Harwood CA, Bergamaschi D (2013). „p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis“. *J Exp Med*. 210(3):581-603
62. Mazzà D, Infante P, Colicchia V, Greco A, Alfonsi R, Siler M, Antonucci L, Po A, De Smaele E, Ferretti E, Capalbo C, Bellavia D, Canettieri G, Giannini G, Screpanti I, Gulino A, Di Marcotullio L (2013). „PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/Gli1

- signaling in p53-dependent response to genotoxic stress“. *Cell Death Differ.* 20(12):1688-1697
63. Moll UM, Slade N (2004). „P63 and P73: Roles in Development and Tumor Formation“. *Mol Cancer Res.* 2(7):371-386
64. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC (2006). „p53/p63/p73 isoforms: An orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress“. *Cell Death Differ.* 13(6):962-972
65. Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe Ki K, Todo S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawara A (2002). „Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter“. *Mol Cell Biol.* 22(8):2575-2585
66. Natan E, Joerger AC (2012). „Structure and kinetic stability of the p63 tetramerization domain“. *J Mol Biol.* 415(3):503-513
67. Ni X, Gu S, Dai J, Cheng H, Guo L, Li L, Ji C, Xie Y, Ying K, Mao Y (2003). „Isolation and characterization of a novel human NM23-H1B gene, a different transcript of NM23-H1“. *J Hum Genet.* 48(2):96-100
68. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B (2006). „Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation“. *Mol Cell Biol.* 26(9):3365-3377
69. Pandolfi S, Montagnani V, Lapucci A, Stecca B (2015). „HEDGEHOG/GLI-E2F1 axis modulates iASPP expression and function and regulates melanoma cell growth“. *Cell Death Differ.* 22(12):2006-2019
70. Patturajan M, Nomoto S, Sommer M, Fomenkov A, Hibi K, Zangen R, Poliak N, Califano J, Trink B, Ratovitski E, Sidransky D (2002). „ $\Delta$ Np63 induces  $\beta$ -catenin nuclear accumulation and signaling“. *Cancer Cell.* 1(4):369-379

- 
71. Pennica D, Goeddel DV, Hayflick JS, Reich NC, Anderson CW, Levine AJ (1984). „The amino acid sequence of murine p53 determined from a c-DNA clone“. *Virology*. 134(2):477-482
72. Perlis C, Herlyn M (2004). „Recent advances in melanoma biology“. *Oncologist*. 9(2):182-187
73. Pflaum J, Schlosser S, Müller M (2014). „p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer“. *Front Oncol*. 4:285
74. Polański R, Maguire M, Nield PC, Jenkins RE, Park BK, Krawczyńska K, Devling T, Ray-Sinha A, Rubbi CP, Vlatkovic N, Boyd MT (2011). „MDM2 interacts with NME2 (non-metastatic cells 2, protein) and suppresses the ability of NME2 to negatively regulate cell motility“. *Carcinogenesis*. 32(8):1133-1142
75. Polsky D, Bastian BC, Hazan C, Melzer K, Pack J, Houghton A, Busam K, Cordon-Cardo C, Osman I (2001). „HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma“. *Cancer Res*. 61(20):7642-7646
76. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS (1991). „Identification of a Second Human nm23 Gene, nm23-H2“. *Cancer Res*. 51(1):445-449
77. Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA (1993). „Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis“. *Science*. 261(5120):478-480
78. Rahman-Roblick R, Roblick UJ, Hellman U, Conrotto P, Liu T, Becker S, Hirschberg D, Jörnvall H, Auer G, Wiman KG (2007). „P53 Targets Identified By Protein Expression Profiling“. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(13):5401-5406
79. Ruiz i Altaba A (1999). „Gli proteins and Hedgehog signaling: Development and cancer“. *Trends Genet*. 15(10):418-425



- 
80. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B (2007). „The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer“. *Trends Cell Biol.* 17(9):438-447
81. Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seuanez HN, O'Brien SJ, Vogelstein B (1988). „The GLI-Kruppel family of human genes“. *Mol Cell Biol.* 8(8):3104-3113
82. Sadam H, Liivas U, Kazantseva A, Pruunsild P, Kazantseva J, Timmusk T, Neuman T, Palm K (2016). „GLI2 cell-specific activity is controlled at the level of transcription and RNA processing: Consequences to cancer metastasis“. *Biochim Biophys Acta.* 1862(1):46-55
83. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H (1999). „Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.“ *Development.* 126(17):3915-3924
84. Satyamoorthy K, Chehab NH, Waterman MJ, Lien MC, El-Deiry WS, Herlyn M, Halazonetis TD (2000). „Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells“. *Cell Growth Differ.* 11(9):467-474
85. Scoumanne A, Harms KL, Chen X (2005). „Structural basis for gene activation by p53 family members“. *Cancer Biol Ther.* 4(11):1178-1185
86. Sinha RP, Häder DP (2002). „UV-induced DNA damage and repair: a review“. *Photoch Photobio Sci.* 1(4):225-236
87. Slade N, Zorić A, Horvat A (2010). „The p53/p63/p73 family of proteins - the focus on isoforms and mutants in cancer“. *Period Biol.* 112(4):425-432
88. Speek M, Njunkova O, Pata I, Valdre E, Kogerman P (2006). „A potential role of alternative splicing in the regulation of the transcriptional activity of human GLI2 in gonadal tissues“. *BMC Mol Biol.* 7:13

- 
89. Stanelle J, Pützer BM (2006). „E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics“. *Trends Mol Med.* 12(4):177-185
90. Stecca B, Ruiz i Altaba A (2009). „A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers“. *EMBO J.* 28(6):663-676
91. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME (1988). „Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential“. *J Natl Cancer Inst.* 80(3): 200-204
92. Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Pützer BM (2002a). „Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene“. *Cancer Res.* 62(13):3598-3602
93. Stiewe T, Theseling CC, Pützer MB (2002b). „Transactivation-deficient  $\Delta$ TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding. Implications for tumorigenesis“. *J Biol Chem.* 277(16):14177-14185
94. Strano S, Rossi M, Fontemaggi G, Munarriz E, Soddu S, Sacchi A, Blandino G (2001). „From p63 to p53 across p73“. *FEBS Lett.* 490:163-170
95. Takahashi R, Markovic S, Scrable H (2014). „Dominant effects of  $\Delta$ 40p53 on p53 function and melanoma cell fate“. *J Invest Dermatol.* 134(3):791-800
96. Terzian T, Torchia EC, Dai D, Robinson SE, Murao K, Stiegmann RA, Gonzalez V, Boyle GM, Powell MB, Pollock PM, Lozano G, Robinson WA, Roop DR, Box NF (2010). „p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation“. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(6):781-794
97. Tsai CL, Hsu FM, Tzen KY, Liu WL, Cheng AI, Cheng JCH (2015). „Sonic Hedgehog inhibition as a strategy to augment radiosensitivity of hepatocellular carcinoma“. *J Gastroenterol Hepatol.* 30:1317-1324
98. Tuve S, Wagner SN, Schitrek B, Pützer BM (2004). „Alterations of DeltaTA-p73 splice

- transcripts during melanoma development and progression“. *Int J Cancer*. 108(1):162-166
99. Vlatković N, Chang SH, Boyd MT (2015). „Janus-faces of NME-oncoprotein interactions“. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 388(2):175-187
100. Vousden KH, Lane DP (2007). „p53 in health and disease“. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(4):275-283
101. Xerri L, Grob JJ, Battyani Z, Gouvernet J, Hassoun J, Bonerandi JJ (1994). „NM23 expression in metastasis of malignant melanoma is a predictive prognostic parameter correlated with survival“. *Br J Cancer*. 70(6):1224-1228
102. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998). „p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities“. *Mol Cell*. 2(3):305-316
103. Yoon JW, Lamm M, Iannaccone S, Higashiyama N, Leong KF, Iannaccone P, Walterhouse D (2015). „P53 modulates the activity of the GLI1 oncogene through interactions with the shared coactivator TAF9“. *DNA Repair*. 34:9-17
104. Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E, Moll UM (2002). „DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors“. *J Exp Med*. 196(6):765-780
105. Zorić A, Horvat A, Slade N (2013). „Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis“. *Carcinogenesis*. 34(3):522-529
106. Zorić A (2009). „Utjecaj mutiranih oblika i izoformi gena p53 na aktivnost gena p73 u stanicama tumora“. (Doktorska disertacija) Zagreb

## 8. SAŽETAK

Metastatski melanom predstavlja najagresivniji oblik raka kože, a napredak u njegovom liječenju otežan je zbog brzog i učestalog razvoja otpornosti na raspoložive lijekove. Kako bi se ponudila nova rješenja u dijagnostici, prognostici i terapiji, potrebni su novi molekularni pristupi u istraživanju melanoma.

U usporedbi s drugim tumorima gdje je stopa mutacija viša od 50%, u melanomu je gen *TP53* rijetko mutiran (manje od 10%). Unatoč niskoj stopi mutacija, p53 ne uspijeva spriječiti nastanak i rast tumora. Stoga se postavlja pitanje što u metastatskom melanomu sprečava divlji tip proteina p53 da obavlja svoje funkcije. Do sada je predloženo nekoliko mehanizama koji uključuju inaktivaciju p53 uslijed prekomjerne ekspresije MDM2, izoforme  $\Delta Np63$ , te izoformi  $\Delta 40p53\alpha$  i  $p53\beta$  koje mijenjaju aktivnost p53. Budući da interakcije p53 imaju značajnu ulogu u tumorigenezi, istražili smo može li funkcija proteina p53 biti promijenjena interakcijama s izoformama p53 niske molekulske mase, izoformama p73, te proteinima iz obitelji NME i GLI.

Analiza ekspresije gena pokazala je sniženu ekspresiju izoformi p53 ( $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 40p53\gamma$ ), izoformi p73 (TAp73 i  $\Delta Np73$ ), te gena *GLI1* i *GLI2* u tkivima metastatskog melanoma čovjeka u odnosu na zdravo tkivo, dok je analiza ekspresije proteina pokazala povišenu ekspresiju izoformi p53 ( $\Delta 133p53\alpha$  i  $\Delta 160p53\alpha$ ), izoformi p73 ( $\Delta Np73\alpha$ ), proteina NME1 i NME2, te izoformi GLI (*GLI1*\_160 kDa, *GLI1*\_130 kDa i *GLI2*\_133 kDa). Ko-immunoprecipitacijom smo pronašli komplekse proteina p53 $\alpha$  s izoformama p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 40p53\beta$  i  $\Delta 133p53\alpha$ , te izoformama TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$ ,  $\Delta Np73\alpha$  i  $\Delta Np53\beta$ , dok komplekse s obitelji NME i GLI nismo pronašli. Luciferaznim testom istražili smo utjecaj proteina od interesa na transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  te smo pokazali da izoforme p53 $\alpha$ , p73 i GLI3 smanjuju transkripcijsku aktivnost p53 $\alpha$  različitim intenzitetom. S druge strane, NME1 i NME2, te napose GLI1 i GLI2 povećali su transkripcijsku aktivnost. Analizom apoptoze na protočnom citometru pokazali smo da svi proteini, osim izoforme p53 $\beta$ , smanjuju apoptotsku aktivnost p53 $\alpha$ . Izoforma p53 $\beta$  pojačava apoptotsku aktivnost p53 $\alpha$ . Definiranje interakcija između proteina p53 $\alpha$  i ostalih proteina moglo bi doprinjeti boljem razumijevanju molekularne podloge nastanka melanoma, te naposljetku dovesti do razvoja novih pristupa u liječenju ove bolesti.

## 9. SUMMARY

Metastatic melanoma represents the most aggressive skin cancer, and advances in its treatment are difficult due to the rapid and frequent development of resistance to available therapies. In order to offer innovative solutions in diagnosis, prognosis and therapy, new molecular approaches in melanoma research are needed.

Unlike other tumors, in melanoma *TP53* is rarely mutated (less than 10%). Despite the low rate of mutations, p53 fails to function as tumor suppressor and tumor cells continue to proliferate and spread. Therefore, the question arises what in the metastatic melanoma prevents the wild type p53 protein to function. So far, several mechanisms have been proposed including p53 inactivation due to excessive expression of MDM2,  $\Delta Np63$  isoform, as well as  $\Delta 40p53\alpha$  and p53 $\beta$  isoforms that alter p53 activity. Since p53 interactions play a significant role in tumorigenesis, we have investigated whether the p53 protein function can be altered by interactions with p53 low molecular weight isoforms, p73 isoforms, and NME and GLI families of proteins.

First, we have determined gene and protein expression of genes of interest. Gene expression analysis showed lower expression of  $\Delta 40p53\beta$  and  $\Delta 40p53\gamma$ , TAp73 and  $\Delta Np73$ , *GLI1* and *GLI2* genes in human metastatic melanoma tissues compared to healthy tissue, while protein expression analysis showed elevated expression of  $\Delta 133p53\alpha$  and  $\Delta 160p53\alpha$ ,  $\Delta Np73\alpha$  isoform, NME1 and NME2 proteins, and GLI1\_160 kDa, GLI1\_130 kDa and GLI2\_133 kDa. Coimmunoprecipitation assay has shown that p53 $\alpha$  forms complex with p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ ,  $\Delta 40p53\alpha$ ,  $\Delta 40p53\beta$  and  $\Delta 133p53\alpha$  isoforms and TAp73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$ ,  $\Delta Np73\alpha$  and  $\Delta Np53\beta$  isoforms. However, we haven't found the complex between p53 $\alpha$  and NME or GLI proteins. Next, using luciferase reporter assay we investigated the effect of proteins of interest on p53 $\alpha$  transcriptional activity and showed that p53 $\alpha$ , p73 and GLI3 isoforms reduce transcriptional activity of p53 $\alpha$  with different intensity. On the other hand, NME1 and NME2, as well as GLI1 and GLI2 increased transcriptional activity. Using flow cytometry, we have shown that the apoptotic activity of p53 $\alpha$  was reduced in all studied proteins, except p53 $\beta$ . On the other hand, p53 $\beta$  isoform enhances apoptotic activity of p53 $\alpha$ . Defining the interactions between protein p53 $\alpha$  and other proteins could contribute to a better understanding of the molecular basis of melanoma and finally lead to the development of new approaches to melanoma treatment.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. studenoga 1988.g. u Zaboku. Osnovnu školu i matematičku gimnaziju završila sam u Zaboku, oboje s izvrsnim uspjehom sudjelujući na brojnim natjecanjima znanja. Godine 2007. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije, te potom 2010.g diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 24.siječnja 2013. g. s izvrsnim uspjehom (prosječna ocjena 4.653). Diplomski rad naziva „Sinteza nano čestica zlata i njihova aplikacija na stanice raka dojke MDA-MB-231“ izradila sam u Laboratoriju za sintezu novih materijala Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Marijana Gotića. Nakon diplome radila sam kao učiteljica prirode, biologije i kemije u osnovnoj školi Stjepana Radića u Brestovcu Orehovičkom, a potom sam godinu dana radila u Laboratoriju za sintezu novih materijala Instituta Ruđer Bošković kod dr. sc. Marijana Gotića na stručnom osposobljavanju. Godine 2015. zaposlena sam kao znanstveni novak (asistent) u Laboratoriju za proteinsku dinamiku Instituta Ruđer Bošković na projektu HRZZ „Otkrivanje novih proteinskih interakcija kao podloga za nove pristupe liječenju melanoma čovjeka,, pod vodstvom dr. sc. Nede Slade. Iste godine upisala sam poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti na Sveučilište u Osijeku. Tijekom izrade doktorskog rada dobila sam stipendiju British Scholarship Trust fundacije (2017. godine) za tromjesečni boravak u Ujedinjenom Kraljevstvu na Zavodu za istraživanje raka Sveučilišta u Dundeeu (Škotska) u laboratoriju dr. sc. Jean-Christophe Bourdona. Sudjelovala sam kao asistent na dva poslijediplomska kolegija pod vodstvom dr.sc. Nede Slade. Bila sam član organizacijskog odbora Četvrte i Pete konferencije Hrvatskog društva za istraživanje raka „From bench to Clinic“ 2016. i 2018. godine, te međunarodne konferencije NDPK2016 koju je organizirao Institut Ruđer Bošković uz sponzorstvo Međunarodnog centra za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (ICGEB) 2016. godine. Bila sam neposredna voditeljica četiri diplomska rada. Sudjelovala sam na jednoj međunarodnoj konferenciji s posterom, te na tri domaće konferencije s prezentacijom postera i usmenim izlaganjem. Članica sam Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR), Europskog društva za istraživanje raka (EACR), Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), Hrvatskog prirodoslovnog društva (HPD), te predstavnica asistenata Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Aktivno sudjelujem u popularizaciji znanosti. Još tijekom studija sudjelovala sam nekoliko puta na manifestaciji Noć biologije, bila sam mentor na nekoliko ljetnih škola znanosti (Ljetna tvornica znanosti, Ljetna škola znanosti S3), a zadnje četiri godine sudjelovala sam na Otvorenim danima

Instituta Ruđer Bošković. Objavila sam tri znanstvena rada. Aktivno se služim engleskim, a pasivno njemačkim i španjolskim jezikom.

**Publikacije:**

1. Hanžić N, Jurkin T, Maksimović A, Gotić M (2015). „The synthesis of gold nanoparticles by a citrate-radiolytical method“. *Radiat Phys Chem.* 106 : 77–82.
2. Hanžić N, Horvat A, Bibić J, Unfried K, Jurkin T, Dražić G, Marijanović I, Slade N, Gotić M (2018). „Syntheses of gold nanoparticles and their impact on the cell cycle in breast cancer cells subjected to megavoltage X-ray irradiation“. *Mat Sci Eng: C.* 91: 486-495.
3. Jazvinščak Jembrek M, Radovanović V, Vlainić J, Vuković L, Hanžić N (2018). „Neuroprotective effect of zolpidem against glutamate-induced toxicity is mediated via the PI3K/Akt pathway and inhibited by PK11195“. *Toxicology.* 406-407 : 58-69.