

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković**

**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij  
Molekularne bioznanosti**

**Anđela Horvat**

**Utjecaj proteina  $\Delta Np73\alpha$  na kontrolu staničnog ciklusa nakon  
oštećenja DNA u stanicama čovjeka**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, 2015.**

## 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: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

### Utjecaj proteina $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA u stanicama čovjeka

Anđela Horvat

**Disertacija je izrađena u:** Laboratoriju za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i Laboratoriju za fosforilaciju i kontrolu staničnog ciklusa Instituta za molekularnu genetiku u Montpellieru (Francuska)

**Mentori:** dr. sc. Neda Slade, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković i dr. sc. Vjekoslav Dulić, znanstvenik CNRS-a u trajnom zvanju, Institut za molekularnu genetiku u Montpellieru (Francuska)

#### Kratki sažetak doktorske disertacije:

U normalnim fibroblastima čovjeka (NHF), fibroblastima koji ekspimiraju protein HPV E6 (NHF-E6) i staničnoj liniji osteosarkoma U2OS ispitali smo utjecaj pojačane ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA. Pokazali smo da  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do narušavanja kontrolne točke G2/M u stanicama U2OS uzrokujući povećanu učestalost poliploidije i doprinoseći genetskoj nestabilnosti. Učinak  $\Delta Np73\alpha$  u normalnim stanicama bio je umjereniji. Ovim radom pružili smo uvid u jedan od mogućih mehanizama kojima protein  $\Delta Np73\alpha$  ostvaruje svoje potencijalno onkogeno djelovanje.

**Broj stranica:** 120

**Broj slika:** 41

**Broj tablica:** 4

**Broj literaturnih navoda:** 220

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:**  $\Delta Np73\alpha$ , kontrola staničnog ciklusa, oštećenje DNA, kontrolna točka G2/M, p21

**Datum obrane:** 22. svibnja 2015.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković, predsjednica
2. dr. sc. Neda Slade, viša znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković, mentor 1 i član
3. dr. sc. Vjekoslav Dulić, znanstvenik CNRS-a u trajnom zvanju, Institut za molekularnu genetiku u Montpellieru (Francuska), mentor 2 i član
4. prof. dr. sc. Dora Višnjić, redovna profesorica Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
5. prof. dr. sc. Vera Cesar, redovna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, član
6. 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:** Biomedicine and healthcare

**Scientific Field:** Basic medical sciences

### The effect of $\Delta Np73\alpha$ on the cell cycle control after DNA damage in human cells

Andela Horvat

**Thesis performed at:** Laboratory of molecular oncology, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, and Laboratory of Phosphorylation and Cell Cycle Control, Institute of Molecular Genetics of Montpellier, Montpellier (France)

**Supervisors:** Neda Slade, PhD, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, and Vjekoslav Dulić, PhD, staff scientist CNRS, Institute for Molecular Genetics in Montpellier (France)

#### Short abstract:

The effect of ectopic  $\Delta Np73\alpha$  overexpression on the cell cycle control after DNA damage was examined in normal human fibroblast (NHF), fibroblasts expressing HPV E6 protein (NHF-E6) and U2OS osteosarcoma cell line. We have shown that  $\Delta Np73\alpha$  leads to abrogation of G2/M DNA damage checkpoint in U2OS cells causing increased frequency of polyploidy and contributing to genetic instability. The same effect of  $\Delta Np73\alpha$  in normal cells was more modest. In this work we provide insight into one of possible mechanisms by which  $\Delta Np73\alpha$  exerts its oncogenic function.

**Number of pages:** 120

**Number of figures:** 41

**Number of tables:** 4

**Number of references:** 220

**Original in:** croatian

**Key words:**  $\Delta Np73\alpha$ , cell cycle control, DNA damage, G2/M checkpoint, p21

**Date of the thesis defense:** 22<sup>th</sup> May 2015

#### Reviewers:

1. Andreja Ambriović Ristov, PhD, senior scientist, Ruđer Bošković Institute, president of the committee
  2. Neda Slade, PhD, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, supervisor 1 and member
  3. Vjekoslav Dulić, PhD, staff scientist CNRS, Institute for Molecular Genetics in Montpellier (France), supervisor 2 and member
  4. Prof. Dora Višnjić, PhD, Full Professor, Department of physiology and immunology, School of medicine, University of Zagreb, member
  5. Prof. Vera Cesar, PhD, Full Professor, Department of biology, J. J. Strossmayer University of Osijek, member
  6. 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 molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Nede Slade, te u Laboratoriju za fosforilaciju i kontrolu staničnog ciklusa Instituta za molekularnu genetiku u Montpellieru (Francuska) pod vodstvom dr. sc. Vjekoslava Dulića

## Zahvaljujem:

- mojoj mentorici dragoj dr. sc. Nedi Slade na ukazanom povjerenju, stalnoj podršci i savjetima koji su mi omogućili izradu ovog rada. Veliko hvala na pruženoj slobodi u istraživanju, na brizi i poticajima u trenucima poteškoća!
- mojem komentoru dragom dr. sc. Vjekoslavu Duliću na podršci i na brojnim savjetima koji su mi jako pomogli u izradi ovog rada. Veliko hvala na svim, uvijek pozitivnim, primjedbama i komentarima koji su doprinijeli da ovaj rad bude što bolji!
- dragoj Arijani na njezinom prijateljstvu od početka mog boravka na Ruđeru, za sve naše razgovore i rasprave o znanosti i drugim važnim stvarima.
- dragoj Nikolini na vedrom raspoloženju i poticajima u zajedničkim kasnim satima u laboratoriju i na tavanu u posljednjoj fazi izrade ovog rada.
- dr. sc. Jasminki Pavelić, voditeljici Laboratorija za molekularnu onkologiju, što mi je omogućila izradu ovog rada i ostalim djelatnicima laboratorija na uvijek ugodnoj atmosferi na 2. katu i tavanu, kao i za pomoć i poticaj kad god je trebalo.
- dr. sc. Danielu Fisheru, voditelju Laboratorija za fosforilaciju i kontrolu staničnog ciklusa, Instituta za molekularnu genetiku u Montpellieru, što mi je dopustio boravak u njegovom laboratoriju, i ostalim djelatnicima laboratorija, osobito dr. sc. Géraldu Lossaintu, na pomoći u snalaženju u novoj sredini.
- djelatnicima ZMM-a i ZMB-a na ugodnom radnom okruženju, i ustupanju potrebnih uređaja i kemikalija, osobito članovima LET-a na pomoći oko protočnog citometra i velikodušnom dijeljenju donglea, Luciji za strpljivo mikroskopiranje na konfokalcu, Maji za kratka druženja i međusobno ohrabrivanje tijekom brojnih vikenda na Ruđeru.
- dr. sc. Branki Mihaljević, voditeljici Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju, i tehničarima istog laboratorija na pomoći pri izvedbi eksperimenata s  $\gamma$ -zračenjem.
- dragim prijateljicama na Ruđeru: Emi, Marini, Jelki i Maji na brojnim zajedničkim ručkovima i ohrabrenjima, i svim ostalim prijateljima na podršci i razumijevanju.
- mojim roditeljima koji su mi uvijek bili vjerna podrška i poticaj za sve što radim, i bratu Juri na svim hitnim intervencijama!
- dragom Nikoli na razumijevanju što su moje stanice „najkompliciranije“ i strpljivom slušanju o problemima i propalim pokusima, dragoj Pauli i Ivanu na strpljenju tijekom svih propuštenih sati i vikenda kada je „mama morala učiti“.

## POPIS KRATICA

**APAF1** (od engl. *apoptotic peptidase activating factor*)

**APC/C** (od engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*)

**ARF** (od engl. *alternative reading frame*)

**ATM** (od engl. *ataxia telangiectasia mutated*)

**ATR** (od engl. *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*)

**ATRIP** (od engl. *ATR-interacting protein*)

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

**BER**, popravak izrezivanjem baze (od engl. *base excision repair*)

**BNIP3** (od engl. *BCL2-interacting protein*)

**BrdU**, bromodeoksiuridin

**c-Abl** (engl. *cellular Abelson leukemia*)

**CAK**, kinaza koja aktivira Cdk (od engl. *Cdk-activating kinase*)

**Cdc2,-6,-7** (od engl. *cell division cycle 2,-6,-7*)

**Cdk**, kinaza ovisna o ciklinima (od engl. *cyclin-dependent kinase*)

**CDT1** (od engl. *cdc10-dependent transcripts 1*)

**Chk1** (od engl. *checkpoint kinase 1*)

**Chk2** (od engl. *checkpoint kinase 2*)

**CKI**, inhibitor Cdk (od engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor*)

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

**Dbf4** (od engl. *dumbbell former 4*)

**DMEM** (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

**DNA-PK** (od engl. *DNA-dependent protein kinase*)

**DNMT1**, DNA-metiltransferaza 1 (od engl. *DNA-methyltransferase 1*)

**DREAM** (od engl. *Dimerization partner (DP), RB-like, E2F and MuvB*)

**FBS**, serum fetusa goveda (od engl. *fetal bovine serum*)

**FLASH** (od engl. *fllice association huge protein*)

**gag** (od engl. *group specific antigenes*)

**HIF 1 $\alpha$**  (od engl. *hypoxia-induced factor 1 $\alpha$* )

**HU**, hidroksiureja

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

**ID2** (od engl. *inhibitor of DNA binding 2*)

**INK4** (od engl. *inhibitors of Cdk4*)

**MAPK** (od engl. *mitogen-activated protein kinase*)

**MCM2,-4,-6** (od engl. *minichromosome maintenance complex subunit 2, 4, 6*)

**MEF**, embrionalni fibroblasti miša (od engl. *mouse embryonic fibroblast*)

**MoMLV** (od engl. *Moloney murine leukemia virus*)

**MPF**, čimbenik koji potiče sazrijevanje (od engl. *maturation promoting factor*)

**NEK2A** (od engl. *NIMA-related kinase 2A*)

**NHF**, normalni fibroblasti čovjeka (od engl. *normal human fibroblast*)

**NLS**, područje za smještanje u jezgru (engl. *nuclear localization signal*)

**NUMA** (od engl. *nuclear mitotic apparatus protein*)

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

**ORC1-6**, kompleks za prepoznavanje ishodišta (od engl. *origin recognition complex subunit 1-6*)

**ORI**, ishodište replikacije (od engl. *origin of replication*)

**PARP-1** (od engl. *poly (ADP-ribose) polymerase-1*)

**PBS** (od engl. *phosphate buffer saline*)

**PCNA** (od engl. *proliferating cell nuclear antigen*)

**PIKK**, kinaza povezana s fosfoinozimid-3-kinazom (od engl. *phosphoinositide 3-kinase related kinase*)

**Plk1** (od engl. *polo-like kinase 1*)

**pRb** (od engl. *protein retinoblastoma*)

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

**preRC**, predreplikacijski kompleks (od engl. *prereplication complex*)

**SAC**, kontrolna točka diobenog vretena (od engl. *spindle assembly checkpoint*)

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

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

**VEGF**, vaskularni endotelni čimbenik rasta (od engl. *vascular endothelial growth factor*)

**ZEB1** (engl. *zinc finger E-box binding homeobox*)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Stanični ciklus</b>	<b>1</b>
1.1.1. Glavni regulatori staničnog ciklusa	2
1.1.2. Kontrola staničnog ciklusa	6
1.1.2.1. Faza G1	6
1.1.2.2. Replikacija DNA (faza S)	8
1.1.2.3. Faza G2	10
1.1.2.4. Mitoza (faza M)	12
<b>1.2. Odgovor na oštećenje DNA</b>	<b>14</b>
1.2.1. Vrste oštećenja DNA i čimbenika koji ih izazivaju	14
1.2.2. Utjecaj oštećenja DNA na stanice i organizam te primjena u liječenju tumora	15
1.2.3. Kontrola staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA	17
1.2.3.1. Kontrolna točka G1/S	19
1.2.3.2. Kontrolna točka u fazi S	20
1.2.3.3. Kontrolna točka G2/M	21
<b>1.3. p73</b>	<b>25</b>
1.3.1. p73 je član obitelji tumorskog supresora p53	25
1.3.1.1. Strukturna obilježja proteina p53, p63 i p73	26
1.3.1.2. Funkcionalna sličnost između članova obitelji p53	27
1.3.2. Izoforme proteina p73	27
1.3.3. Regulacija aktivnosti gena/proteina p73	29
1.3.4. Uloga proteina p73 u tumorigenezi	30
1.3.4.1. Uloga izoformi TAp73	30
1.3.4.2. Uloga izoformi $\Delta$ Np73	32
1.3.5. Uloga p73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA	33
1.3.5.1. Uloga TAp73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA	34
1.3.5.2. Uloga $\Delta$ Np73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA	35
<b>2. CILJ RADA</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Stanične linije i rad sa staničnim kulturama <i>in vitro</i></b>	<b>38</b>
3.1.1. Tretman agensima koji oštećuju DNA	39
3.1.2. Sinkronizacija stanica u fazi G1/S	39
<b>3.2. Retrovirusna infekcija normalnih i tumorskih staničnih linija</b>	<b>39</b>
3.2.1. Uspostavljanje i održavanje kulture pakirajućih stanica Phoenix A	41
3.2.2. Transfekcija stanica za pakiranje Phoenix A	41
3.2.3. Retrovirusna infekcija ciljnih stanica	41
<b>3.3. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot</b>	<b>42</b>
3.3.1. Izdvajanje proteina	42
3.3.2. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA i priprema uzoraka za elektroforezu	43
3.3.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida	44
3.3.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na membranu nitroceluloze	45

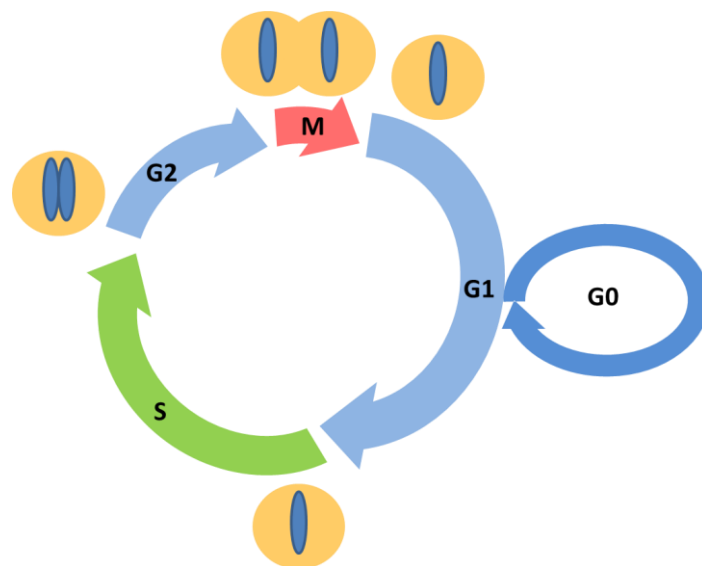


3.3.5.	Bojenje naftolnim plavilom i blokiranje membrane _____	45
3.3.6.	Imunodetekcija proteina na membrani _____	46
<b>3.4.</b>	<b>Analiza ekspresije proteina metodom imunofluorescencije _____</b>	<b>47</b>
3.4.1.	Fiksacija i permeabilizacija stanica _____	47
3.4.2.	Imunodetekcija proteina _____	48
<b>3.5.</b>	<b>Analiza ulaska stanica u replikaciju ugradnjom bromodeoksiuridina _____</b>	<b>48</b>
<b>3.6.</b>	<b>Analiza staničnog ciklusa metodom protočne citometrije _____</b>	<b>49</b>
<b>3.7.</b>	<b>Videomikroskopija s protokom vremena _____</b>	<b>50</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI _____</b>	<b>52</b>
<b>4.1.</b>	<b>Analiza ekspresije <math>\Delta Np73\alpha</math> u normalnim i tumorskim staničnim linijama _____</b>	<b>52</b>
4.1.1.	Analiza endogene ekspresije izoforme $\Delta Np73\alpha$ _____	52
4.1.2.	Ektopična ekspresija $\Delta Np73\alpha$ u stanicama NHF _____	53
4.1.2.1.	Ovisnost ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ o različitim uvjetima rasta stanica NHF _____	54
<b>4.2.</b>	<b>Uloga ektopične ekspresije <math>\Delta Np73\alpha</math> u odgovoru stanica NHF i NHF-E6 na oštećenje DNA _____</b>	<b>58</b>
4.2.1.	Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa u stanicama NHF nakon $\gamma$ -zračenja _____	58
4.2.2.	Utjecaj ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ na zastoj ciklusa izazvan bleomicinom i ICRF-om u stanicama NHF _____	61
4.2.3.	Usporedba utjecaja ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ na prevladavanje zastoja staničnog ciklusa nakon tretmana stanica NHF bleomicinom i $\gamma$ -zračenjem _____	65
4.2.4.	Utjecaj ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ na funkciju kontrolne točke G2/M u stanicama NHF i NHF-E6 nakon $\gamma$ -zračenja _____	69
4.2.4.1.	NHF _____	69
4.2.4.2.	NHF-E6 _____	72
<b>4.3.</b>	<b>Uloga ektopične ekspresije <math>\Delta Np73\alpha</math> u odgovoru stanica U2OS na oštećenje DNA _____</b>	<b>74</b>
4.3.1.	Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa u stanicama U2OS nakon $\gamma$ -zračenja _____	75
4.3.2.	Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na izlazak iz ciklusa stanica U2OS nakon $\gamma$ -zračenja _____	78
4.3.3.	Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na ekspresiju regulatora odgovora na oštećenje DNA izazvano bleomicinom _____	80
4.3.4.	Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na prevladavanje zastoja u G2/M nakon tretmana ICRF-om _____	82
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA _____</b>	<b>87</b>
<b>5.1.</b>	<b>p73 u tumorigenezi _____</b>	<b>87</b>
<b>5.2.</b>	<b><math>\Delta Np73\alpha</math> i kontrolna točka G2/M u stanicama NHF _____</b>	<b>89</b>
<b>5.3.</b>	<b><math>\Delta Np73\alpha</math> i kontrolna točka G2/M u stanicama U2OS _____</b>	<b>91</b>
<b>5.4.</b>	<b>Mehanizam djelovanja <math>\Delta Np73\alpha</math> _____</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI _____</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA _____</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK _____</b>	<b>117</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY _____</b>	<b>118</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS _____</b>	<b>119</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Stanični ciklus

Temeljni proces koji omogućava nastanak i održavanje života na Zemlji je dioba stanica. Taj uređeni slijed precizno kontroliranih događaja nazvan je staničnim ciklusom, a omogućava jednoliku raspodjelu ukupnog staničnog sadržaja na stanice kćeri (**Slika 1**). Većina staničnih komponenti (citoplazmatski organeli, membrane, strukturni proteini, molekule RNA) sintetiziraju se tijekom čitavog staničnog ciklusa. No, udvostručenje genomske DNA, odnosno replikacija događa se samo jednom, tijekom faze S (od engl. *synthesis*) koja kod tipične stanice sisavaca traje 10 sati obuhvaćajući gotovo polovicu od ukupnog trajanja ciklusa. Drugi važan proces koji osigurava vjerno prenošenje ukupnog genetskog materijala stanice na novu generaciju obuhvaća razdvajanje kromosoma i staničnu diobu (citokineza) koji čine fazu M (od engl. *mitosis*). Mitoza kod stanica sisavaca obično traje kraće od 1 sata.



**Slika 1: Shematski prikaz staničnog ciklusa tipične eukariotske stanice.** Pojednostavljeno je u obliku jednog kromosoma prikazano što se događa s genetskim materijalom stanice kroz različite faze staničnog ciklusa. Nakon mitoze (M), u fazi G1 stanice kćeri sadrže  $2N$  kromosoma u slučaju diploidnog organizma. Tijekom faze S dolazi do sinteze DNA, što dovodi do udvostručenja broja kromosoma ( $4N$ ) s kojima stanica ulazi u G2. Po izlasku iz G2, u fazi M dolazi do razdvajanja sestrinskih kromatida, nakon čega se stanica potpuno podijeli na dvije genetički identične stanice kćeri (citokineza). U nepovoljnim uvjetima rasta (odsutnosti čimbenika rasta ili prisutnosti inhibitornih signala od okolnih stanica - kontaktnoj inhibiciji) stanica može izaći iz ciklusa i ući u stanje mirovanja (G0).

Za pravilno odvijanje replikacije DNA i mitoze potreban je niz unutarstaničnih i izvanstaničnih čimbenika, ponajprije proteina, koji sudjeluju u regulaciji tih procesa, te drugih staničnih komponenti koje osiguravaju potreban popratni stanični rast. Njihova sinteza najvećim dijelom odvija se u fazama G1 (nakon M, a prije S) te G2 (nakon S, a prije M) (od engl. *gap*). Faze G1, S i G2 po trajanju obuhvaćaju gotovo cijeli stanični ciklus sisavaca, te ih se zajednički naziva interfazom (međufazom). Tijekom faza G1 i G2 dolazi do stroge regulacije prijelaza stanice u iduću fazu pod utjecajem različitih izvanstaničnih i unutarstaničnih čimbenika. Stanica je osobito osjetljiva na nepovoljne uvjete rasta i inhibitorne signale od susjednih stanica u fazi G1, tijekom koje u određenim uvjetima stanice višestaničnog organizma mogu izaći iz ciklusa, te ući u stanje mirovanja, fazu G0 i u njoj ostati danima, mjesecima ili čak tijekom cijelog života jedinke (Morgan, 2007).

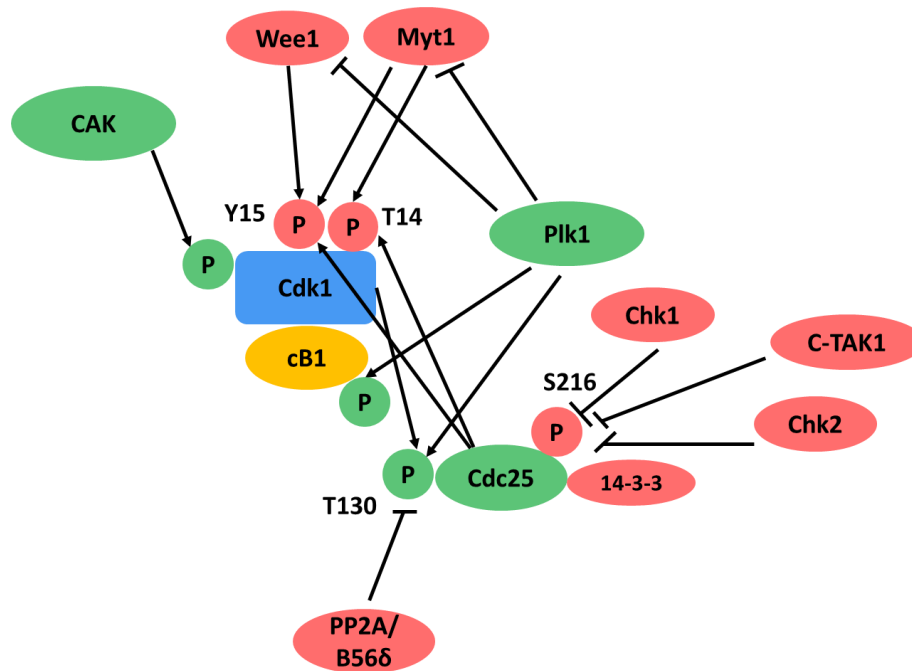
Budući da su organizacija i mehanizmi kontrole staničnog ciklusa očuvani tijekom evolucije počevši od jednostavnih pa sve do najnaprednijih eukariota, u istraživanjima je bilo moguće koristiti različite modelne sustave. Većina temeljnih spoznaja o funkcioniranju staničnog ciklusa proizišla je iz eksperimenata na kvascu, vinskoj mušici, embrijima žabe, morskog ježinca i školjkaša, te stanicama sisavaca uzgajanima u kulturi. U ovom literaturnom pregledu radi jednostavnosti ograničit ćemo se na prikaz regulacije staničnog ciklusa u stanicama sisavaca.

### **1.1.1. Glavni regulatori staničnog ciklusa**

Glavni pokretači prolaska stanica kroz pojedine faze staničnog ciklusa su kinaze ovisne o ciklinima (Cdk, od engl. *cyclin-dependent kinase*), koje mogu biti aktivne jedino u kompleksu s odgovarajućom regulatornom podjedinicom, ciklinom. Ciklini su proteini čija se razina mijenja periodično tijekom staničnog ciklusa, odakle im i potječe naziv, dok je razina Cdk nepromjenjiva (Evans i sur., 1983). U stanicama čovjeka dosad je poznato 13 genskih lokusa za različite Cdk i 25 za različite cikline, od kojih samo dio izravno sudjeluje u kontroli staničnog ciklusa. Komplekse ciklin-Cdk, ključne za odvijanje pojedinih faza, tvori jedna od moguće tri interfazne Cdk (Cdk2, Cdk4 ili Cdk6), odnosno jedne mitotske (nazvane Cdk1 ili Cdc2, od engl. *cell division cycle 2*), u kombinaciji s točno određenim ciklinom, jednim od 10 mogućih podijeljenih u 4 skupine (ciklini tipa A, B, D i E) (Malumbres i Barbacid, 2009).

Aktivnost Cdk strogo je regulirana putem mreže različitih kinaza i fosfataza (Morgan, 1995). Uz prisutnost ciklina, za aktivnost Cdk ključno je djelovanje kinaze koja aktivira Cdk (CAK, od engl. *Cdk-activating kinase*). CAK je sastavljena od tri podjedinice: Cdk7, ciklina H i MAT1, a osim u progresiji staničnog ciklusa, ima ulogu i u transkripciji čineći dio kompleksa transkripcijskog faktora TFIIH (Roy i sur., 1994). Stvaranje kompleksa između ciklina i Cdk smatra se kritičnim korakom u aktivaciji Cdk, budući da dovodi do promjene konformacije u području koje sadrži T-omču, mjestu fosforilacije pomoću CAK, čineći ga dostupnijim (Jeffrey i sur., 1995).

Fosforilacija može imati i suprotan, inhibitoran učinak na Cdk, ako se dogodi u aktivnom mjestu Cdk koje veže ATP (Atherton-Fessler i sur., 1994). U tom je mjestu kod najvažnijih Cdk prisutan tirozin na položaju 15 (Y15), a fosforilira ga kinaza Wee1 (Parker i sur., 1992). Kod Cdk sisavaca važna je i fosforilacija susjednog treonina na položaju 14 (T14) pomoću kinaze Myt1 (može fosforilirati i Y15) (Liu i sur., 1997). Suprotno, fosfataze iz obitelji Cdc25 defosforiliraju Cdk na položajima T14 i Y15 čime ih aktiviraju (Strausfeld i sur., 1991). Osobito je dobro proučeno djelovanje Wee1 i Cdc25 na regulaciju aktivnosti kompleksa ciklin B1-Cdk1, potrebnog za ulazak u mitozu (**Slika 2**). Aktivnosti Wee1 i Cdc25 također su precizno kontrolirane tijekom staničnog ciklusa djelovanjem brojnih kinaza i fosfataza, često istih, ali s različitim učinkom (npr. Cdk1, Chk1, Plk1). U neaktivnom stanju fosfataza Cdc25 fosforilirana je na položaju S216 djelovanjem kinaza Chk1 (od engl. *checkpoint kinase 1*), Chk2 (od engl. *checkpoint kinase 2*) (Matsuoka i sur., 1998; Peng i sur., 1997; Sanchez i sur., 1997) te C-TAK1 (Ogg i sur., 1994; Peng i sur., 1998), čime je omogućena njezina interakcija s proteinom 14-3-3. Za aktivaciju Cdc25 nužna je fosforilacija na položaju T130 pomoću npr. Cdk2 i Plk1 (od engl. *polo-like kinase 1*), nakon čega je moguće oslobađanje od veze s 14-3-3 te defosforiliranje na položaju S216 (Perry i Kornbluth, 2007). S druge strane fosfataza PP2A/B56δ defosforilira T130 čime inhibira Cdc25, odnosno onemogućava aktivaciju kompleksa ciklin B1-Cdk1 (Margolis i sur., 2006). Plk1 može fosforilirati i kinaze Wee1 i Myt1 inaktivirajući ih, te ciklin B1 omogućavajući aktivnost kompleksa ciklin B1-Cdk1. Plk1 fosforilira i niz drugih proteina koji imaju ulogu u ulasku i izlasku iz mitoze (Van Vugt i sur., 2005).



**Slika 2: Glavni regulatori staničnog ciklusa (na primjeru regulacije aktivnosti kompleksa ciklin B1-Cdk1).** Pozitivni regulatori aktivnosti kompleksa ciklin B1-Cdk1 prikazani su zelenim, a negativni crvenim elipsama; aktivirajuće fosfatne skupine prikazane su zelenim, a inhibirajuće crvenim krugovima. Uz prisutnost ciklina B1 za aktivnost Cdk1 nužna je fosforilacija pomoću CAK. S druge strane fosforilacija Cdk1 na položajima Y15 (pomoću Wee1 i Myt1) te T14 (pomoću Myt1) dovodi do njezine inaktivacije. Njima suprotno djelovanje ima fosfataza Cdc25 koja defosforilira Cdk1 na položajima Y15 i T14 omogućavajući njezinu aktivaciju. Sama Cdc25 također je regulirana djelovanjem različitih kinaza i fosfataza. Fosforilacija Cdc25 na položaju S216 (djelovanjem Chk1, Chk2 ili C-TAK1) potrebna je za interakciju s proteinom 14-3-3 koja održava Cdc25 u neaktivnom stanju. Uz Cdk1, i kinaza Plk1 može fosforilirati Cdc25 na položaju T130, važnom za njezinu aktivaciju. S druge strane, fosfataza PP2A/B56δ inhibira Cdc25 defosforilacijom na položaju T130. Plk1 doprinosi aktivaciji kompleksa ciklin B1-Cdk1 fosforilacijom samog ciklina B1 i Cdc25, te inaktivacijom kinaza Wee1 i Myt1.

Uz inhibiciju aktivnosti Cdk fosforilacijom, postoji cijela skupina proteina pod imenom inhibitori Cdk (CKI, od engl. *cyclin-dependent kinase inhibitors*) podijeljenih u dvije obitelji na temelju sličnosti u evolucijskom podrijetlu, strukturi i sposobnosti djelovanja na određene Cdk.

1) Obitelj INK4 (od engl. *inhibitors of Cdk4*) obuhvaća četiri proteina (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> i p19<sup>INK4d</sup>) koji inhibiraju Cdk4 i Cdk6 onemogućavajući njihovo vezanje sa ciklinima tipa D.

2) Obitelj Cip/Kip pokazuju šire područje djelovanja vežući se na Cdk i pripadajuće im cikline svih četiriju tipova. Ovu obitelj čine tri člana: p21<sup>Cip1/Waf1/Sdi1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> te p57<sup>Kip2</sup>. Sva tri proteina imaju slično N-terminalno područje odgovorno za vezanje na cikline i Cdk, dok se

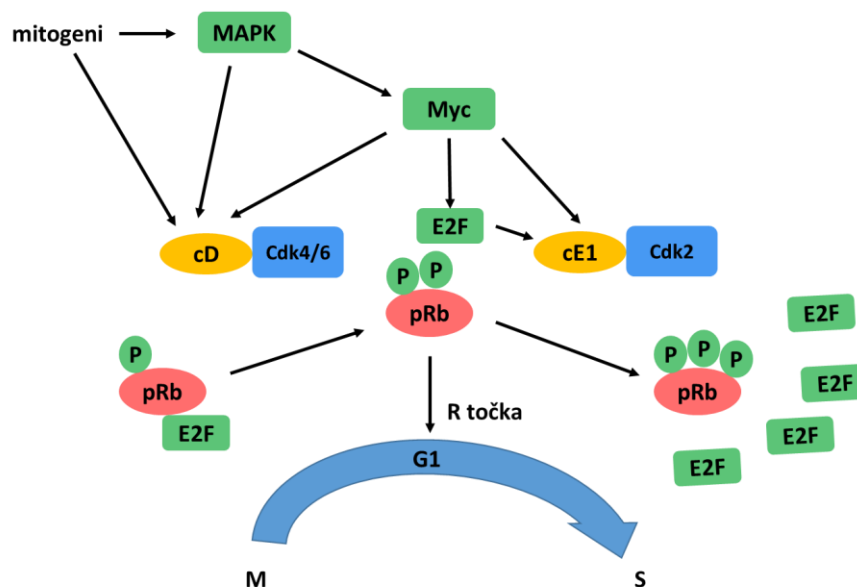
ostatak proteinskog slijeda značajno razlikuje ukazujući na moguće razlike u ulozi i regulaciji ovih proteina. Doista, tijekom godina istraživanja prikupljeni su brojni dokazi o njihovoj ulozi u ograničavanju proliferacije u različitim uvjetima, koja je često specifična i ograničena na pojedine članove i uvjete. Tako razina proteina p27 raste kada je stanica izložena odsutnosti mitogena ili u drugim stanjima vezanim za mirovanje, izlazak iz ciklusa, dok p57 ima moguću ulogu u kontroli staničnog ciklusa tijekom embrionalnog razvoja (Sherr i Roberts, 1999).

Uz sudjelovanje u replikaciji i mitozu, Cdk svoju ulogu u proliferaciji ostvaruju ponajprije inhibicijom aktivnosti tumor supresorskog proteina retinoblastoma (pRb) koji ima ključnu ulogu u zaustavljanju staničnog ciklusa uslijed nepovoljnih uvjeta rasta ili oštećenja genoma. pRb je prvi put identificiran kod pacijenata oboljelih od malignog tumora retine, retinoblastoma, pri čemu je nastala hipoteza o nužnosti dvaju događaja za razvoj tumora, tzv. hipoteza dva hitca (Knudson, 1971). Danas je poznato da je funkcija pRb narušena u većini tumora čovjeka izravnim (mutacije, delecije) ili neizravnim mehanizmima (promjena aktivnosti i/ili ekspresije uzvodnih regulatora)(Liu i sur., 2004b). pRb, zajedno sa p107 i p130, čini obitelj „*pocket*“ proteina, čiji naziv dolazi od sačuvanog strukturnog područja putem kojeg ovi proteini stupaju u interakcije s drugim proteinima među kojima su osobito bitni članovi obitelji transkripcijskih faktora E2F (Dyson, 1998). p130 također ima značajnu ulogu u regulaciji progresije staničnog ciklusa, čineći dio kompleksa DREAM (od engl. *Dimerization partner (DP), RB-like, E2F and MuvB*), koji tijekom stanja mirovanja (G0) inhibira ekspresiju većine gena potrebnih za odvijanje staničnog ciklusa (Sadasivam i DeCaprio, 2013). Aktivnost pRb regulirana je posttranslacijski tijekom staničnog ciklusa, pri čemu je ključna uloga odgovarajućih kompleksa ciklin-Cdk koji fosforilacijom inaktiviraju pRb, nakon čega dolazi do oslobađanja faktora E2F koji zatim potiču transkripciju niza ciljnih gena potrebnih za progresiju ciklusa.

Osim preko inhibicije faktora E2F, pRb može inhibirati transkripciju različitih gena stupanjem u interakciju s proteinima poput hBRM, BRG1, HDAC1 i SUV39H1, uključenima u remodeliranje nukleosoma, acetilaciju/deacetilaciju histona i metilaciju, uzrokujući remodeliranje strukture kromatina (Giacinti i Giordano, 2006). Nadalje, danas je poznat još širi spektar različitih proteina s kojima pRb može stupiti u interakciju sudjelujući u različitim staničnim procesima, čime njegov utjecaj seže daleko dalje od njegove uloge u kontroli staničnog ciklusa. I sama uloga pRb u tumorigenezi je složena. Naime, pRb može djelovati



uključenih u progresiju staničnog ciklusa. Porastom razine kompleksa ciklin D-Cdk4/6 dolazi do postupne fosforilacije pRb. Kada stupanj fosforiliranosti pRb dosegne kritičnu razinu, dolazi do prekida veze između pRb i E2F. Prekidanjem veze između pRb i faktora E2F dolazi i do prekida interakcije pRb s faktorima uključenim u remodeliranje kromatina čime prestaje njegovo inhibitorno djelovanje na transkripciju niza gena. Oslobođeni E2F ponajprije dovodi do ekspresije ciklina E1 koji u kompleksu sa Cdk2 provodi konačnu fosforilaciju pRb, čime se postiže njegova konačna inaktivacija i omogućava transkripcija niza gena potrebnih za ulazak u fazu S i njezino odvijanje (**Slika 4**) (Deckbar i sur., 2011).



**Slika 4: Tijek faze G1 i ulazak u fazu S.** Na početku faze G1 protein retinoblastoma (pRb) u hipofosforiliranom obliku veže transkripcijske faktore E2F. Djelovanjem kompleksa ciklina tipa D (cD) i Cdk4/6 dolazi do fosforilacije (P) pRb, i postupnog oslobađanja E2F koji onda može potaknuti transkripciju gena za ciklin E1 (cE1) čime dolazi do nakupljanja aktivnog kompleksa ciklin E1-Cdk2. Time je omogućena daljnja fosforilacija pRb i potpuno oslobađanje faktora E2F koji onda aktiviraju transkripciju niza gena potrebnih za ulazak stanice u fazu S i M. Restriksijska (R) točka označava kratak period u fazi G1 nakon koje daljnji tijek staničnog ciklusa postaje neovisan o mitogenima. Za odvijanje faze G1 i ulazak stanice u fazu S važan je i onkoprotein Myc koji potiče ekspresiju ciklina D, E1, kao i E2F, a kojeg između ostalog aktivira i signalni put kinaza MAPK (od engl. *mitogen-activated protein kinase*) koji može potaknuti ekspresiju ciklina D i preko drugih transkripcijskih faktora.

Već je dugo poznato da u fazi G1 postoji jedan kratki period nakon kojeg daljnji tijek ciklusa postaje neovisan o prisutnosti vanjskih čimbenika rasta, a naziva se restriksijska točka. Novija definicija restriksijske točke uzima u obzir postupnu fosforilaciju pRb, te se odnosi na onaj trenutak u fazi G1 kada je postignuta dostatna razina fosforilacije pRb koja omogućava početak oslobađanja E2F, odnosno sintezu ciklina E1, i koja dovodi do

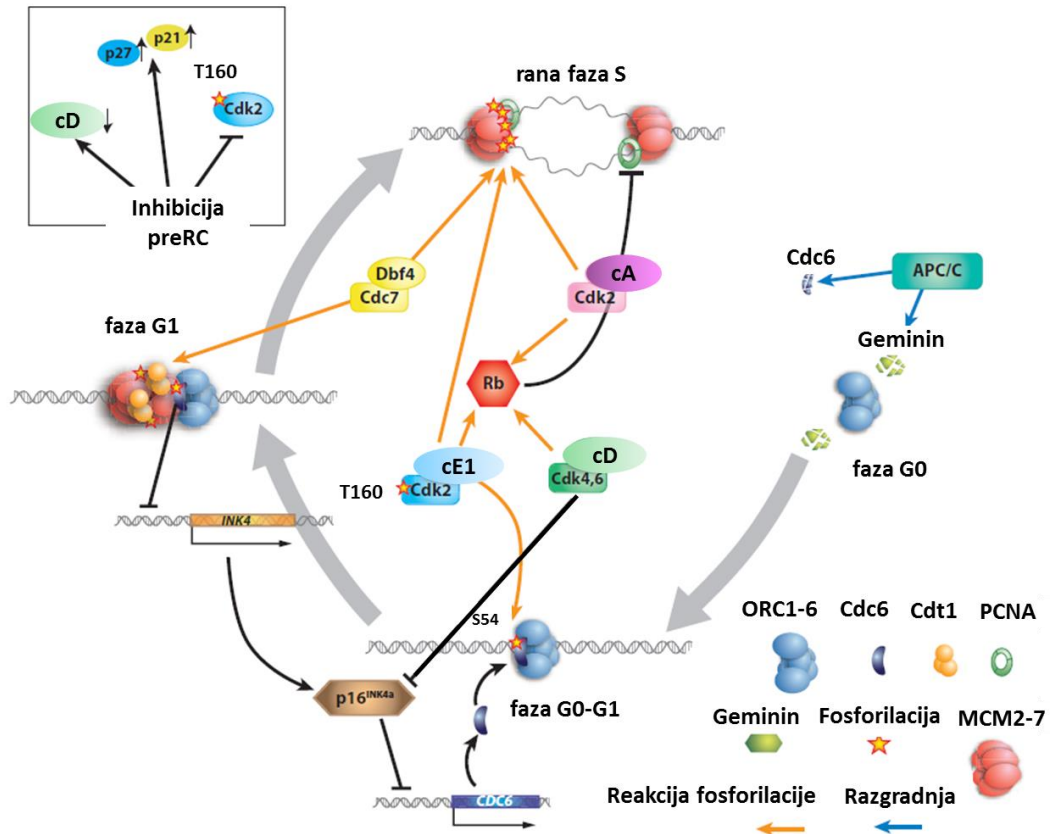


transkripcije gena koji su bili izravno potisnuti djelovanjem pRb (Yao i sur., 2008). Uz postupnu fosforilaciju, odnosno inaktivaciju pRb, važnu ulogu u regulaciji ulaska stanice u fazu S ima Myc, transkripcijski faktor uključen u aktivaciju ciklina D1, D2, E1, Cdc25A te čimbenika E2F (Leone i sur., 1997; Galaktionov i sur., 1996; Santoni-Rugiu i sur., 2000). Pod utjecajem mitogenih signala dolazi do aktivacije signalnog puta kinaza MAPK (od engl. *mitogen-activated protein kinase*) što dovodi do aktivacije Myc, ali i drugih faktora koji potiču proliferaciju (Zhang i Liu, 2002). Djelujući u istom smjeru, pRb i Myc omogućavaju nakupljanje aktivnog kompleksa ciklin E1-Cdk2 koji zatim fosforilira Cdc45, kinazu odgovornu za početak replikacije, na mjestima prethodno pripremljenih ishodišta replikacije (Iliakis i sur., 2003).

### **1.1.2.2. Replikacija DNA (faza S)**

Postoji niz strogo kontroliranih mehanizama koji osiguravaju da stanica tijekom jednog ciklusa samo jednom udvostruči svoj genetski materijal. Sama sinteza DNA odvija se tijekom faze S, no preduvjeti za njezino odvijanje kao i početak formiranja kompleksa nužnih za replikaciju ostvaruju se već krajem mitoze, te tijekom faze G1 (**Slika 5**) (Masai i sur., 2010). Prva faza replikacije, inicijacija, odvija se u nekoliko koraka. Pred kraj mitoze dolazi do vezanja kompleksa za prepoznavanje ishodišta (ORC, od engl. *origin recognition complex*) na kromatin na ishodištima replikacije (ORI, od engl. *origin of replication*) raspoređenim po genomu stanice (Bell i Stillman, 1992). Na ulazu u fazu G1 dolazi do vezanja proteina Cdc6 te Cdt1 na ORC, potrebnih za vezanje DNA helikaze MCM na kromatin (Speck i sur., 2005; Chen i sur., 2007; You i Masai, 2008). Vezanjem helikaze MCM formiran je predreplikacijski kompleks (preRC, od engl. *prereplication complex*). Za formiranje preRC važna je aktivnost kompleksa ciklin E1-Cdk2 koji fosforiliranjem Cdc6 na položaju S54 onemogućava njegovu razgradnju djelovanjem kompleksa APC/C (od engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*). Do formiranja preRC može doći jedino u razdoblju od kraja mitoze do kasne faze G1, čime je onemogućena ponovna replikacija DNA (rereplikacija) prije odvijanja mitoze (Nishitani i sur., 2001). Najvažniji način regulacije kojim se to postiže je regulacija aktivnosti Cdt1 razgradnjom ili djelovanjem njegovog specifičnog inhibitora geminina (McGarry i Kirschner, 1998; Wohlschlegel i sur., 2000; Takeda i sur., 2005). Na prijelazu G1/S dolazi do vezanja ostalih proteina na pre-RC djelovanjem kinaza Cdc7-Dbf4 i Cdk nužnih za

aktivaciju replikacijske DNA helikaze (Masai i sur., 2006; Yabuuchi i sur., 2006; Francis i sur., 2009). Za početak replikacije potrebna je aktivnost kompleksa ciklin A-Cdk2, koji ujedno i sprečava formiranje novih preRC (Mailand i Diffley, 2005).



**Slika 5: Povezanost tijekom faze G1 i replikacije.** Na prijelazu iz G0 u G1 dolazi do razgradnje geminina i Cdc6 pomoću kompleksa APC/C. Budući da je protein Cdc6 potreban za formiranje preRC njegova razgradnja tijekom faze G1 privremeno je onemogućena fosforilacijom pomoću kompleksa ciklin E1-Cdk2 na položaju S54. Uz Cdc6, za formiranje preRC nužan je protein Cdt1 te fosforilacija MCM2, -4 i -6 na N-kraju djelovanjem Cdc7. CKI p16<sup>INK4a</sup> inhibira transkripciju gena za Cdc6. Formiranje preRC nužno je za ekspresiju ciklina D i aktivirajuću fosforilaciju Cdk2 na položaju T160. U slučaju poremećaja u formiranju preRC dolazi do inhibicije aktivnosti Cdk2 gubitkom fosforilacije na položaju T160, smanjenja razine ciklina D te porasta razine p21 i p27. U tom slučaju pRb inhibira regulatore faze G1 i faktore replikacijske mašinerije tijekom faze S. pRb uzrokuje smanjenje razine kompleksa ciklin A-Cdk2 što remeti djelovanje PCNA (od engl. *proliferating cell nuclear antigen* još uvijek nepoznatim mehanizmom. Narančaste strelice označavaju reakcije fosforilacije, a plave razgradnju ciljnih proteina; APC/C (od engl. *anaphase promoting complex/cyclosome*); Cdc6,-7 (od engl. *cell division cycle 6,-7*); Cdt1 (od engl. *cdc10-dependent transcripts 1*); Dbf4 (od engl. *dumbbell former 4*); MCM2,-4,-6 (od engl. *minichromosome maintenance complex subunit 2, 4, 6*); ORC1-6 (od engl. *origin recognition complex subunit 1-6*)(preuzeto i prilagođeno prema Masai i sur., 2010).

Regulatori faze G1 imaju značajnu ulogu u replikaciji DNA (**Slika 5**). Ponajprije, transkripcijski faktori E2F aktiviraju ekspresiju niza faktora potrebnih za početak replikacije (Cdc6, Mcm7...) te Cdc45 na prijelazu G1/S. Nasuprot tome, CKI p16<sup>INK4a</sup> onemogućava

formiranje preRC kao rezultat smanjenja ekspresije Cdc6 i Cdt1. Cdk tijekom G1 uzrokuju stabilizaciju Cdc6 fosforilacijom na položaju S54, osiguravajući vrijeme potrebno za formiranje preRC (Mailand i Diffley, 2005; Duursma i Agami, 2005). Osim kao izravni transkripcijski faktor ili preko E2F, pRb može regulirati replikaciju interakcijom s MCM7 (Sternier i sur., 1998), te poremećajem uloge PCNA (Braden i sur., 2006).

Pokazalo se da je odnos replikacije te odvijanja faze G1 i prijelaza u fazu S još dinamičniji i međuovisan. Tako u slučaju poremećaja u formiranju preRC dolazi do odgode u progresiji faze G1 putem različitih mehanizama koji uključuju smanjenje transkripcije ciklina D1, indukciju p21 i p27, gubitak fosforilacije Cdk2 na položaju T160 bitne za njezinu aktivnost (Machida i sur., 2005; Liu i sur., 2009; Nevis i sur., 2009).

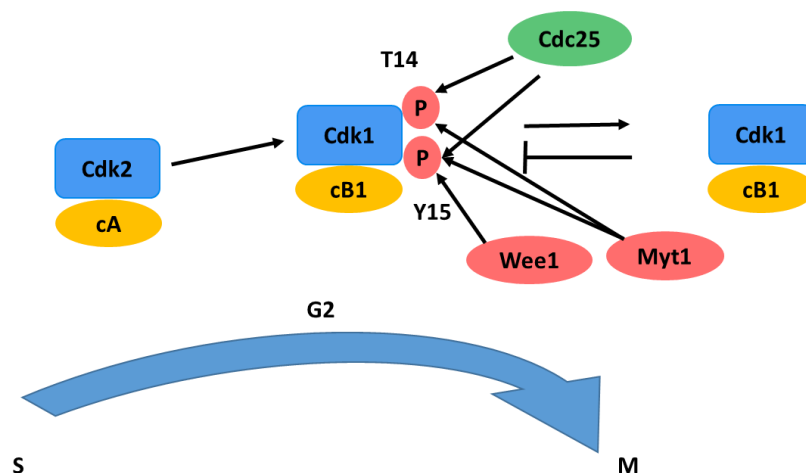
Unatoč postojanju strogih mehanizama regulacije, u određenim okolnostima može doći do ponovne replikacije (rereplikacije), a da stanica prethodno nije prošla kroz mitozu. U tom slučaju stanica u fazi G1 ima 4N kromosoma, te nakon ponovne replikacije DNA (endoreduplikacija) stanica postaje poliploidna. Do toga može doći zbog poremećaja telomera, poremećaja u popravku DNA te ekspresije onkogena uslijed čega dolazi do trajnije aktivacije kinaza ATM/ATR (Davoli i de Lange, 2011).

### **1.1.2.3. Faza G2**

Za odvijanje faze G2 važna je prisutnost ciklina A i B1, u kompleksu s odgovarajućom Cdk (Cdk2 i/ili Cdk1). Ciklin A počinje se sintetizirati krajem G1, te biva razgrađen prije metafaze, dok se ciklin B1 pojavljuje u fazi S, najvišu razinu dostiže u profazi, a biva razgrađen u anafazi. Precizna regulacija razine ovih ciklina postiže se ravnotežom između regulacije transkripcije i proteolize, u čemu sudjeluju različiti transkripcijski faktori (B-MYB, E2F, FOXM1, NF-Y), odnosno ubikvitinske ligaze (APC/C-CDC20, APC/C-CDH1, SCF) (Fung i Poon, 2005).

Na početku faze G2 dolazi do pojačane aktivacije novih kompleksa ciklin A-Cdk2 djelovanjem fosfataze Cdc25 (Goldstone i sur., 2001). Iako ciklin A u fazi G2 može tvoriti kompleks i s Cdk1, zastupljenost i aktivnost kompleksa ciklin A-Cdk2 znatno je veća (Pagano i sur., 1992; Pagano i sur., 1993; Rosenblatt i sur., 1992). Aktivnost kompleksa ciklin A-Cdk2 postiže svoj vrhunac u G2, nešto prije aktivacije kompleksa ciklin B1-Cdk1, ranije poznatog pod nazivom čimbenik koji potiče sazrijevanje (MPF, od engl. *maturation promoting factor*)

koji je ključan za ulazak stanice u mitozu. Prethodna aktivnost kompleksa ciklin A-Cdk2 pokazala se nužnom za formiranje i aktivaciju kompleksa ciklin B1-Cdk1, a time i za početak mitoze (De Boer i sur., 2008). Mogući mehanizmi putem kojih kompleks ciklin A-Cdk2 ostvaruje to djelovanje je uključenost u aktivaciju (Furuno i sur., 1999; Mitra i Enders, 2004) i stabilizaciju ciklina B1 inhibicijom kompleksa APC/C (Lukas i sur., 1999). Kompleks ciklin A-Cdk2 uočen je u području centrosoma krajem faze G2 neposredno nakon razdvajanja parova centrosoma, što dodatno upućuje na njegovu uključenost u procese bitne za odvijanje mitoze (De Boer i sur., 2008).



**Slika 6: Tijek faze G2 i ulazak u mitozu.** Za ulazak stanice u mitozu najvažnije je djelovanje kompleksa ciklin B1-Cdk1, uz prethodnu aktivnost kompleksa ciklin A-Cdk1. Cdk1 je podložna fosforilaciji pomoću kinaza Wee1 (na položaju T14) i Myt1 (na položajima T14 i Y15) pri čemu dolazi do inaktivacije kompleksa ciklin B1-Cdk1. Za aktivnost kompleksa ciklin B1-Cdk1 neophodno je djelovanje fosfataze Cdc25 koja defosforilira Cdk1 na spomenutim položajima.

Tijekom faze G2 kompleks ciklin B1-Cdk1 je neaktivan zbog neprekidnog prijenosa iz jezgre u citoplazmu i zbog toga što kinaze Wee1 i Myt1 fosforiliraju Cdk1 na položajima Y15 i T14 (Nigg, 2001) (**Slika 6**). U kasnoj G2 kompleks ciklin B1-Cdk1 dopijeva u područje centrosoma. Tada je u području centrosoma lokalizirana i kinaza Chk1, te se pretpostavlja da inhibicijom fosfataze Cdc25 onemogućava aktivaciju Cdk1 i sprečava prerani ulazak u mitozu. Budući da se već u profazi Chk1 više ne nalazi u području centrosoma smatra se da na prijelazu G2/M dolazi do njezinog otpuštanja sa centrosoma te aktivacije kompleksa ciklin B1-Cdk1 pomoću Cdc25 (Krämer i sur., 2004). Aktivacija kompleksa ciklin B1-Cdk1 počinje u citoplazmi na centrosomima (Jackman i sur., 2003), nakon čega dolazi do prijenosa u jezgru i daljnje aktivacije djelovanjem Cdc25 (De Souza i sur., 2000). Noviji model predlaže da

fosforilacija Chk1 u jezgri djelovanjem Cdk1 uzrokuje translokaciju Chk1 iz jezgre što zatim omogućava daljnju aktivaciju kompleksa ciklin B1-Cdk1 (Enomoto i sur., 2009; Matsuyama i sur., 2011). Aktivirani kompleks ciklin B1/Cdk1 fosforilira Wee1 i Cdc25, uzrokujući njihovu inhibiciju, odnosno aktivaciju, te pozitivnom povratnom spregom omogućava aktivaciju novih kompleksa (Fung i Poon, 2005).

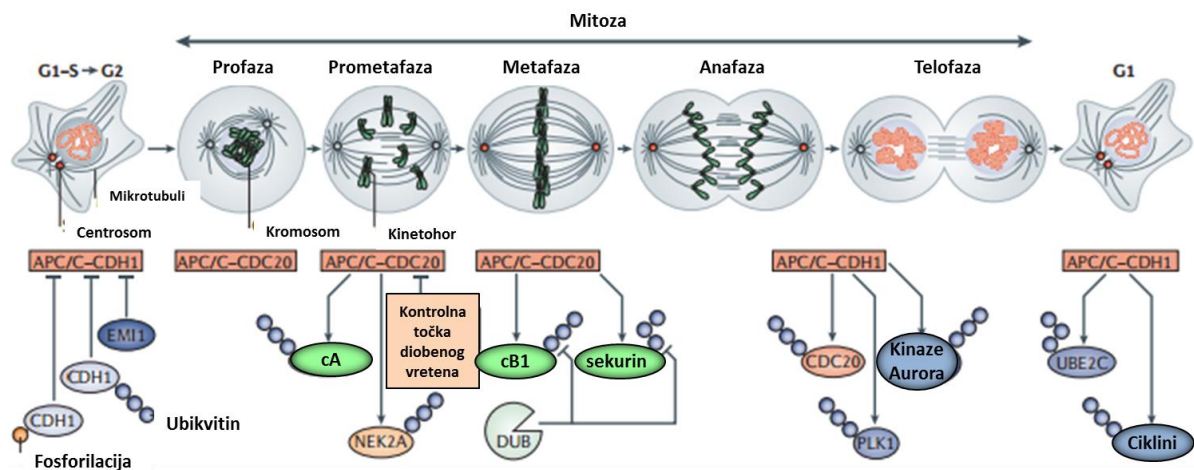
#### **1.1.2.4. Mitoza (faza M)**

Tijekom mitoze (faze M) dolazi do pravilne raspodjele genetskog materijala stanice na dvije stanice kćeri. Pravovremeno odvijanje događaja uključenih u razdvajanje kromosoma (mitoza) i citokinezu ima ključnu ulogu u održavanju genetskog integriteta stanice, sprečavajući nepravilnosti poput aneuploidije i poliploidije koje mogu doprinosti procesu tumorigeneze (Sivakumar i Gorbsky, 2015). Za ulazak u mitozu i njezino odvijanje nužna je Cdk1 koja u kompleksu s ciklinom A i B1 tijekom faze G2 i rane mitoze fosforilira veliki broj čimbenika. Ti čimbenici između ostaloga sudjeluju u procesima razdvajanja centrosoma, raspada jezgrine ovojnice, fragmentiranja Golgijevog aparata i endoplazmatskog retikuluma, kondenzaciji kromosoma te formiranju diobenog vretena (Malumbres i Barbacid, 2009).

Prva faza mitoze, profaza, započinje kondenzacijom kromosoma, a završava početkom formiranja diobenog vretena te raspadom jezgrine ovojnice (**Slika 7**). Raspad jezgrine ovojnice omogućava vezanje kromosoma na mikrotubule diobenog vretena preko kinetohora. Važnost ovog koraka očituje se i u postojanju posebnog regulatornog mehanizma nazvanog kontrolnom točkom diobenog vretena (SAC, od engl. *spindle assembly checkpoint*) koji sprečava nastavak mitoze u slučaju kada svi kromosomi nisu preko kinetohora pravilno vezani na mikrotubule diobenog vretena (Lara-Gonzalez i sur., 2012). U prometafazi kromosomi se kreću prema sredini stanice te u metafazi dolazi do smještanja svih kromosoma u metafaznoj ravnini. Za ulazak u anafazu neophodna je razgradnja veze između sestrinskih kromatida koju tvori kohezin. Nakon što posljednji kromosom zauzme svoj položaj u metafaznoj ravnini dolazi do ubrzane ubikvitinacije i razgradnje sekurina koji je dotad štiti kohezinski kompleks od djelovanja separaze, proteaze koja zatim omogućava razdvajanje kromatida. Razgradnja sekurina omogućena je aktivacijom kompleksa E3-ubikvitinske ligaze APC/C-CDC20 koji uzrokuje i razgradnju ciklina B1 i A, čime inaktivira

Cdk1. Nakon anafaze APC/C se nalazi u kompleksu s CDH1 (od engl. *CDC20 homologue 1*) uzrokujući razgradnju CDC20, Plk1 i kinaza Aurora A i B (Sigl i sur., 2009; García-Higuera i sur., 2008; Floyd i sur., 2008).

APC/C stoga, uz kompleks ciklin B1-Cdk1, zauzima središnje mjesto u odvijanju mitoze. Aktivnost APC/C regulirana je vremenski i prostorno stupanjem u interakciju s različitim koaktivatorima, inhibitorima, te djelovanjem različitih kinaza i fosfataza (**Slika 7**). Tijekom interfaze važnu ulogu u regulaciji aktivnosti kompleksa APC/C ima Emi1, njegov inhibitor koji omogućava nakupljanje mitotskih regulatora potrebnih za ulazak u mitozu. U ranoj mitozu dolazi do razgradnje Emi1 (Margottin-Goguet i sur., 2003; Hansen i sur., 2004; Moshe i sur., 2004), te preostaje jedino u području polova diobenog vretena povezan s NUMA (od engl. *nuclear mitotic apparatus protein*) i kompleksom dinein-dinaktin što dovodi do nakupljanja APC/C oko polova vretena (Jörgensen i sur., 1998). Za održavanje APC/C u hipofosforiliranom stanju nužna je fosfataza PP2A, nasuprot APC/C u citoplazmi koji je izrazito fosforiliran u mitotskim stanicama prije anafaze (Torres i sur., 2010). Pretpostavlja se da Emi1 inhibirajući APC/C u području polova vretena blokira razgradnju ciklina omogućavajući aktivnost Cdk1 (Sivakumar i Gorbsky, 2015).



**Slika 7: Regulacija tijekom mitoze uređenom razgradnjom supstrata posredovanom djelovanjem ligaze APC/C.** APC/C ubikvitinira proteine uzrokujući njihovu razgradnju u određenom razdoblju te na taj način omogućava progresiju staničnog ciklusa. U ranoj mitozu i sredinom mitoze APC/C djeluje u kompleksu s CDC20 (APC/C-CDC20), dok nakon početka anafaze, tijekom izlaska iz mitoze i tijekom faze G1 djeluje u kompleksu s CDH1 (od engl. *CDC20 homologue 1*). U prometafazi APC/C-CDC20 ubikvitinira ciklin A i NEK2A (od engl. *NIMA-related kinase 2A*) uzrokujući njihovu razgradnju, dok je djelovanje na sekurin i ciklin B1 onemogućeno kontrolnom točkom diobenog vretena. U metafazi dolazi do inaktivacije kontrolne točke diobenog vretena, te intenzivne ubikvitinacije sekurina i ciklina B1. Na izlasku iz mitoze APC/C-CDH1 ubikvitinira CDC20, kinaze Aurora A i B, te Plk1 (preuzeto i prilagođeno prema Sivakumar i Gorbsky, 2015).

## 1.2. Odgovor na oštećenje DNA

Glavna biološka zadaća svih živih bića je osigurati vjerno prenošenje nepromijenjenog i sačuvanog vlastitog genetskog materijala sljedećoj generaciji. Budući da je molekula DNA konstantno izložena djelovanju različitih unutarnjih i vanjskih čimbenika koji izazivaju mnogobrojne različite vrste oštećenja, u stanicama je razvijen niz međusobno isprepletenih mehanizama pod zajedničkim nazivom odgovor na oštećenje DNA (engl. *DNA-damage response*, DDR) (Jackson i sur., 2009). Zahvaljujući velikom broju otkrića tijekom posljednja dva desetljeća danas su poznati detaljniji molekularni mehanizmi ovog složenog puta prijenosa signala kojima se ostvaruje detekcija oštećenja DNA, prienos i pojačavanje signala te ravnoteža između fosforilacije i ubikvitinacije proteina, dvaju procesa bitnih za odgovor na oštećenje (Harper i Elledge, 2007).

### 1.2.1. Vrste oštećenja DNA i čimbenika koji ih izazivaju

Čimbenici koji mogu izazvati oštećenje DNA mogu biti unutarnji (endogeni) i vanjski (egzogeni). Najznačajniji unutarnji čimbenici su različiti poremećaji u metabolizmu DNA (povremeno krivo sparivanje baza tijekom sinteze DNA, prekid aktivnosti topoizomeraze I/II), reakcije hidrolize ili ne-enzimske metilacije, oksidacijskog disanja te ciklusa limunske kiseline, upale i infekcije. Kao posljedica svega toga nastaju različite vrste oštećenja DNA poput adukata, gubitka baza, jednolančanih lomova te najrjeđih, ali i najopasnijih dvolančanih lomova.

U vanjske čimbenike ubrajaju se okolišni agensi među kojima su najpoznatiji ultraljubičasto zračenje, ionizirajuće zračenje te različiti kemijski agensi, koji također mogu izazvati različite oblike oštećenja DNA (**Tablica 1**) (Jackson i sur., 2009).

**Tablica 1: Glavni vanjski čimbenici koji izazivaju oštećenje DNA i vrste oštećenja**

<b>Vanjski čimbenici</b>	<b>Vrsta oštećenja DNA</b>
<b>Ultraljubičasto zračenje</b>	UV-foto-produkti, O6-alkil-gvanin
<b>Ionizirajuće zračenje i radiomimetici</b> (bleomicin)	Jednolančani i dvolančani lomovi, oštećenja baza
<b>Monofunkcionalni alkilatori</b> (alkilni sulfonati, složenice nitrozoureje, temozolomid)	Oštećenja baza, replikacijske lezije, stvaranje adukata
<b>Bifunkcionalni alkilatori</b> (cisplatina, mitomicin C, psoralen)	Dvolančani lomovi, križne veze s DNA, replikacijske lezije, stvaranje adukata
<b>Antimetaboliti</b> (tiopurini, 5-fluoruracil, analozi folata, gemcitabin)	Nekarakterizirana oštećenja, oštećenja baza, replikacijske lezije
<b>Inhibitori topoizomeraza</b> (kamptotecin, etopozid, doksorubicin, ICRF-193)	Dvolančani i jednolančani lomovi, replikacijske lezije
<b>Inhibitori replikacije</b> (afidikolin, hidroksiureja)	Dvolančani lomovi, replikacijske lezije

### **1.2.2. Utjecaj oštećenja DNA na stanice i organizam te primjena u liječenju tumora**

Nakon djelovanja određenih endogenih ili egzogenih čimbenika koji oštećuju DNA i pojave specifičnih oblika lezija u DNA, dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa čija je glavna svrha onemogućiti replikaciju oštećene DNA i ulazak stanice u mitozu. Da bi se osiguralo vrijeme za popravak nastalih oštećenja, stanica raspolaže složenim mehanizmima regulacije nazvanim kontrolnim točkama na prijelazu faze G1 u S, unutar faze S, te na prijelazu faze G2 u M. U slučaju prevelikog oštećenja, kontrolne točke omogućit će odlazak stanice u apoptozu ili senescenciju (Jackson i sur., 2009). Senescencija je stanje ireverzibilnog zastoja staničnog ciklusa do kojeg dolazi zbog skraćivanja telomera u somatskim stanicama (replikativno starenje) ili djelovanja onkogeno (preuranjeno starenje). Do senescencije može doći i nakon genotoksičnog stresa koji aktivira signalne puteve odgovora na oštećenje, između ostalog kontrolne točke koje dovode do zastoja ciklusa i izlaska stanica iz ciklusa (Kuilman i sur., 2010). Nedavno su pronađeni dokazi o povezanosti senescencije sa starenjem organizma. Selektivno uklanjanje senescentnih stanica u mišu dovelo je do



odgode u razvoju patoloških stanja u određenim tkivima povezanih sa starošću (Baker i sur., 2011).

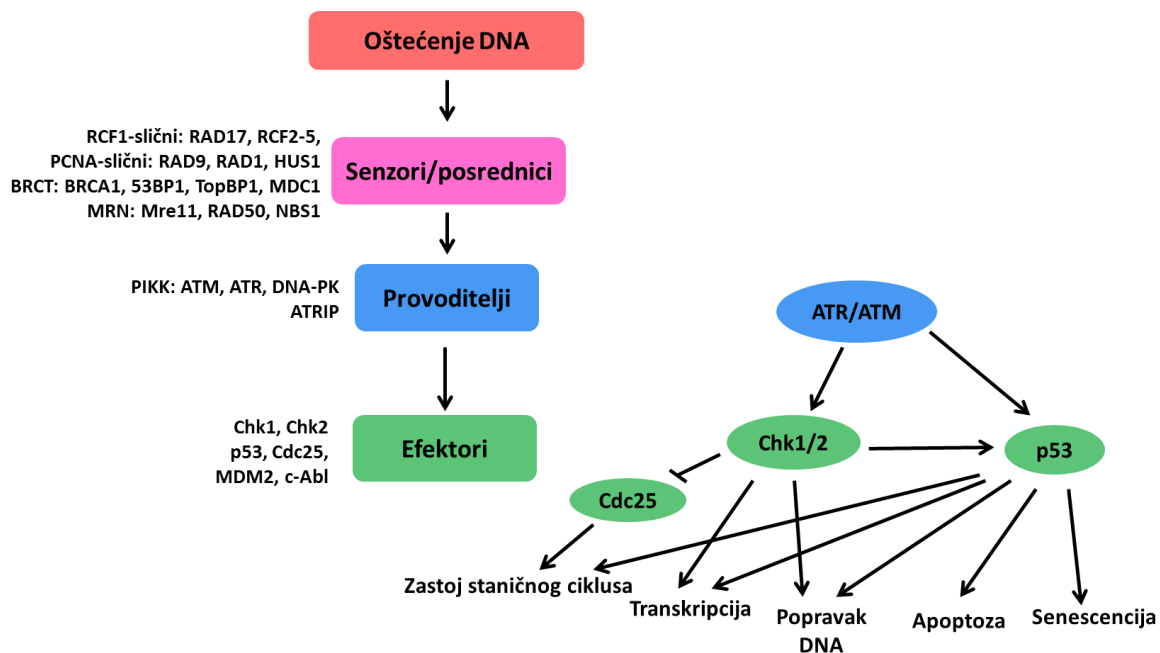
Zbog spomenutog štetnog djelovanja na stanice, različiti agensi koji izazivaju oštećenje DNA primjenjuju se u liječenju tumora u vidu kemoterapije i radioterapije čiji je cilj eliminacija tumorskih stanica. Agensi koji oštećuju DNA danas se kombiniraju s različitim specifičnim lijekovima kako bi pojačali odgovor tumorskih stanica na terapiju.

U tumorskim stanicama često dolazi do poremećaja u jednom ili više puteva odgovora na oštećenje DNA, što se u većini slučajeva povezuje s boljim odgovorom na terapiju. U odgovor na oštećenje DNA uključeni su i različiti mehanizmi popravka DNA, te se njihova inhibicija pokazala učinkovitom u razvoju novih protutumorskih terapija (Helleday i sur., 2008; Martin i sur., 2008). Naime, različiti putevi popravka DNA su isprepleteni i ovisni jedni o drugima, tako da tumorske stanice koje već imaju nefunkcionalan određeni tip popravka pokazuju veću osjetljivost na inhibiciju drugog puta, u odnosu na normalne stanice. Poznati primjer primjene ovog principa jesu inhibitori PARP-1 (od engl. *poly (ADP-ribose) polymerase*), enzima uključenog u prepoznavanje jednolančanih i dvolančanih lomova u DNA, važnog u popravku izrezivanjem baze (BER, od engl. *base excision repair*), i učinkovitog u tretmanu tumora koji nemaju funkcionalan popravak homolognom rekombinacijom (Farmer i sur., 2005; Bryant i sur., 2005). Analogno, inhibicija Chk1 u tumorima kod kojih je nefunkcionalan p53 također dovodi do pojačane osjetljivosti na oštećenje DNA u odnosu na stanice s funkcionalnim p53 (Chen i sur., 2006). S druge strane, u ranoj fazi tumorigeneze pronađeni su markeri aktivacije odgovora na oštećenje (Bartkova i sur., 2005; Gorgoulis i Vassiliou, 2005), što bi moglo doprinijeti osjetljivosti i učestalosti rane detekcije tumora. Uz inhibiciju određenih signalnih puteva odgovora na oštećenje DNA, mogući budući pravci za razvoj novih protutumorskih terapija uključuju, s jedne strane pojačavanje određenih puteva odgovora na oštećenje ili pak pronalazak alternativnih načina kontrole rasta/održavanja tumora bez primjene agresivnih tretmana (Jackson i sur., 2009; Gatenby, 2009).

### 1.2.3. Kontrola staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA

Dva temeljna puta uključena u stanični odgovor na oštećenje DNA su popravak DNA i regulacija tijeka staničnog ciklusa. Različiti mehanizmi popravka DNA predstavljaju prvu liniju obrane, odnosno uklanjanje nastalih oštećenja, zbog čega su putevi odgovora na oštećenje DNA i popravka DNA usko povezani (Jackson i sur., 2009). Budući da popravak DNA zahtijeva određeno vrijeme, nužno je usporavanje ili zaustavljanje staničnog ciklusa dok se oštećenje ne popravi. U protivnom, ovisno o tipu stanice, dolazi do apoptoze ili trajnog zastoja staničnog ciklusa (senescencije).

Prema općenito prihvaćenom modelu (Zhou i Elledge, 2000), proces aktivacije kontrolnih točaka uključuje senzore (engl. *sensors*) i posrednike (engl. *mediators*) oštećenja DNA, te provoditelje (engl. *transducers*) i efektore (engl. *effectors*) signala (**Slika 8**). Senzori su odgovorni za početak signalne kaskade, te izravno ili neizravno prepoznaju mjesta oštećenja DNA. Unatoč brojnim poteškoćama pri pokušaju identifikacije senzornih proteina danas ih je poznat veći broj i mogu se svrstati u nekoliko razreda. S njima su usko vezani proteini posrednici, također bitni za provođenje signala oštećenja. Provoditelji signala su obično proteinske kinaze koje fosforilacijom prenose signal na druge kinaze ili nizvodne ciljane proteine (efektore). Među njima središnje mjesto zauzimaju kinaze povezane s fosfoinozimid-3-kinazom (od engl. *phosphoinositide 3-kinase related kinase*, PIKK): ATM (od engl. *ataxia telangiectasia mutated*), ATR (od engl. *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) te prema novijim saznanjima DNA-PK (od engl. *DNA-dependent protein kinase*) (Bartek i Lukas, 2007; Shiloh, 2003). Njihove glavne nizvodne mete su efektorske kinaze Chk1 i Chk2. Efektori su krajnje nizvodne mete kinaza, a djeluju na mjestu gdje se povezuju kontrolna točka odgovora na oštećenje DNA i procesi staničnog ciklusa. U efektore spadaju i tumorski supresor p53, fosfataze iz obitelji Cdc25, kao i općenito regulatori staničnog ciklusa.



**Slika 8: Glavne komponente signalnih puteva odgovora na oštećenje DNA.** U prepoznavanju signala oštećenja važni su senzori i posrednici, i danas ih je poznat veći broj. Signal dalje prenose provoditelji među kojima su najvažnije kinaze ATR i ATM, a njihove najvažnije nizvodne mete su efektorske kinaze Chk1 i Chk2. Jedan od načina na koji ostvaruju svoju ulogu je fosforilacija fosfataza Cdc25 čime dovode do zastoja staničnog ciklusa. U efektore spada i protein p53 koji zauzima središnje mjesto u nizu procesa koji odlučuju o sudbini stanice nakon genotoksičnog stresa. Protein p53 aktivira se fosforilacijom, bilo izravno djelovanjem ATM/ATR ili preko Chk1/Chk2 (prilagođeno prema Zhou and Elledge, 2000).

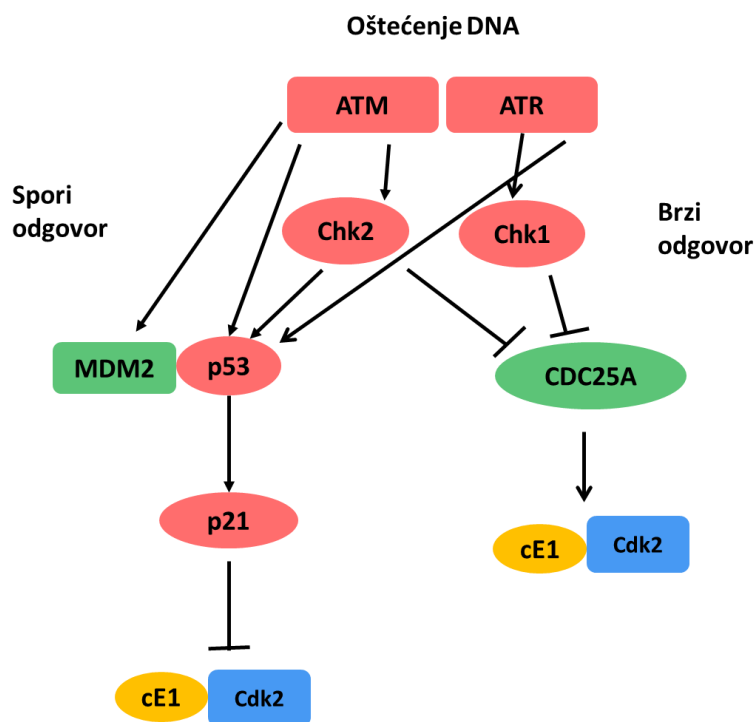
Usporedno sa sve intenzivnijim istraživanjem mehanizama staničnog odgovora na oštećenje DNA, dolazilo se do novih spoznaja o kontroli staničnog ciklusa, što se pokazalo ključnim za njihovo bolje razumijevanje. Danas se smatra kako kontrola staničnog ciklusa obuhvaća niz međusobno ovisnih regulatornih prijelaza čija je svrha dovesti molekulu DNA u takvo stanje u kojem je moguće njezino udvostručenje i dioba. U tome presudnu ulogu imaju Cdk, kao i mehanizmi proteolize te promjene u stanju kromatina (Harper i Elledge, 2007).

S vremenom je postalo jasno da Cdk imaju važnu ulogu i u odgovoru na oštećenje DNA, kao glavne mete djelovanja različitih sudionika tog odgovora. Iako se kontrolne točke staničnog ciklusa i kontrolne točke odgovora na oštećenje DNA konceptualno razlikuju, s novim otkrićima postaju očite sve brojnije sličnosti među njima (Iliakis i sur., 2003).

### 1.2.3.1. Kontrolna točka G1/S

U slučaju oštećenja DNA tijekom faze G1, u svrhu sprečavanja ulaska stanice s oštećenjem u fazu S, dolazi do aktivacije signalne kaskade poznate pod nazivom kontrolna točka G1/S koja inhibira komplekse ciklin D-Cdk4/6 i ciklin E1-Cdk2 potrebne za ulazak u fazu S. Dva su moguća puta, različita po svojoj kinetici, kojima se to postiže: okosnica Chk2/Cdc25 i p53/p21, dok im je ishodište, ATM/ATR, zajedničko (**Slika 9**) (Iliakis i sur., 2003).

Put koji se prvi aktivira nakon oštećenja uključuje aktivaciju ATM ili ATR (ovisno o izvoru ili prirodi oštećenja DNA) koja onda fosforilira i aktivira Chk2 (Matsuoka i sur., 2000; Falck i sur., 2001), odnosno Chk1, koja pak fosforilira fosfatazu Cdc25A, čime ona gubi sposobnost aktivirajućeg djelovanja na Cdk2 (Costanzo i sur., 2000; Zhou i Elledge, 2000; Abraham, 2001). Uz inaktivaciju Cdc25A fosforilacijom, dolazi i do njezine ubikvitinacije te proteosomalne razgradnje, što dodatno pojačava odgovor na oštećenje (Mailand i sur., 2000).



**Slika 9: Aktivacija kontrolne točke G1/S.** Postoje dva moguća puta aktivacije koja imaju isto ishodište, ATM ili ATR. Signalni put koji se brže aktivira ide preko kinaza Chk2 ili Chk1 koje fosforilacijom inaktiviraju fosfatazu Cdc25A čime je onemogućeno njezino djelovanje na kompleks ciklin E1-Cdk2. Sporiji signalni put uključuje fosforilaciju p53 i njegovog negativnog regulatora MDM2 čime dolazi do nakupljanja aktivnog p53 koji zatim preko p21 blokira aktivnost kompleksa ciklin E1-Cdk2.

Drugi, važniji signalni put regulacije kontrolne točke G1/S uključuje posttranslacijske modifikacije proteina te transkripcijsku aktivaciju ciljnih gena zbog čega je njegova aktivacija sporija. U njemu središnje mjesto zauzima tumorski supresor p53 koji svoju ulogu najčešće ostvaruje kao transkripcijski faktor, djelujući na ekspresiju niza gena potrebnih za odvijanje različitih staničnih procesa (Levine, 1997). Ovaj put također započinje fosforilacijom ATM ili ATR, koje zatim omogućavaju stabilizaciju i aktivaciju proteina p53 izravnom fosforilacijom (na položaju S15) (Rotman i Shiloh, 1999) te preko Chk2 odnosno Chk1 koje fosforiliraju p53 na položaju S20 (Hirao i sur., 2000; Chehab i sur., 2000; Shieh i sur., 2000). Razina proteina p53 u stanici pri normalnim uvjetima je niska (njegovo vrijeme poluživota je kratko) i pod kontrolom je E3-ubikvitinske ligaze MDM2 (Wu i Levine, 1997). MDM2 stvara kompleks sa p53 te ga na taj način inaktivira i posreduje u njegovoj razgradnji djelovanjem proteosomalnog kompleksa (Chen i sur., 1996; Haupt i sur., 1997). Istodobno, p53 može potaknuti ekspresiju MDM2 čineći omču negativne povratne sprege koja ima važnu ulogu među složenim procesima uključenim u tumorigenezu (Picksley i Lane, 1993). Fosforilacija p53 na položaju S20 dovodi do prekida veze između proteina p53 i MDM2, što omogućava aktivaciju i stabilizaciju p53. ATM/ATR i Chk2/Chk1 mogu izravno fosforilirati i MDM2, dajući dodatni doprinos ovom procesu (Khosravi i sur., 1999). Aktivirani p53 zatim potiče transkripciju ciljnih gena među kojima je za kontrolnu točku G1/S najvažniji protein p21, koji inaktivira kompleks ciklin E1-Cdk2 čime onemogućava fosforilaciju pRb i ulazak stanice u fazu S (Dulić i sur., 1994).

### **1.2.3.2. Kontrolna točka u fazi S**

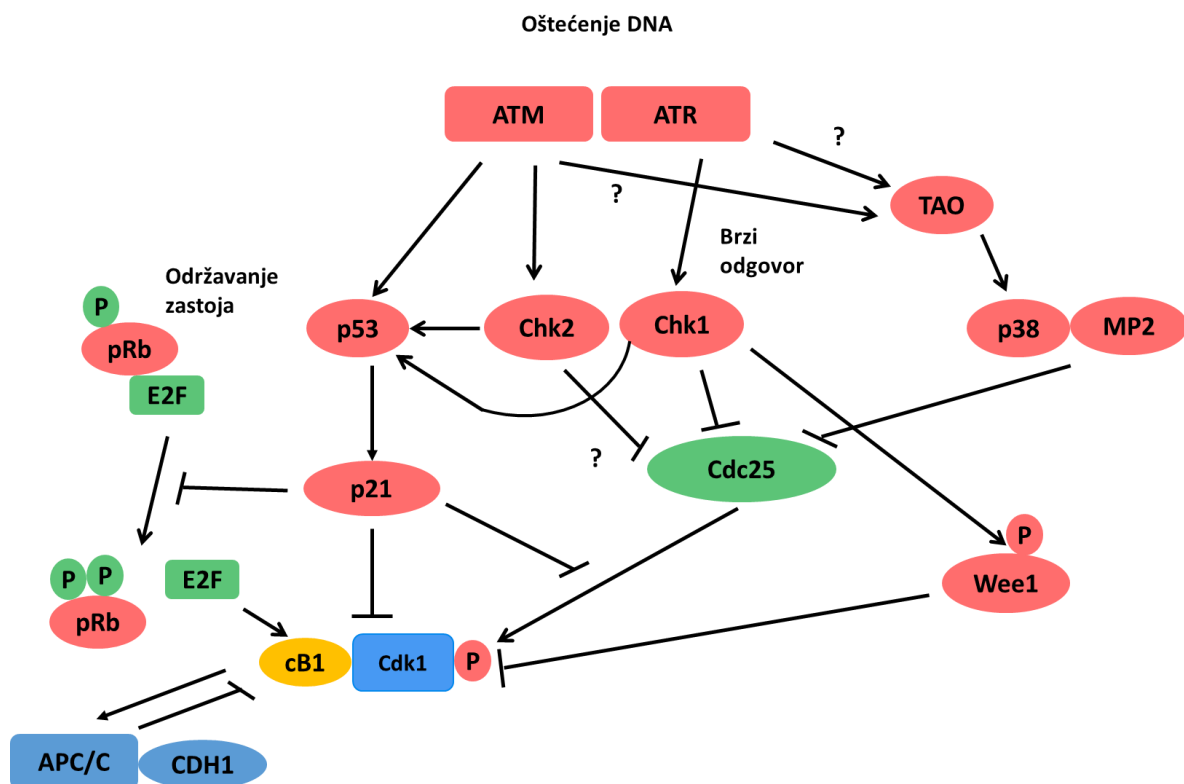
Odvijanje replikacije DNA pod strogom je regulacijom kontrolne točke u fazi S (engl. *intra-S-checkpoint*) koja se aktivira u slučaju replikacijskog stresa. Na postojanje ove kontrolne točke ukazala je pojava privremenog zaustavljanja ugradnje radioaktivnih prekursora u DNA tijekom replikacije nakon djelovanja ionizirajućeg zračenja (Lavin i Schroeder, 1988; Larner i sur., 1997). U okviru ove kontrolne točke dolazi do smanjenja ukupne stope replikacije DNA što se postiže inhibicijom inicijacije replikacije s novih ishodišta i/ili usporavanjem postojećih replikacijskih rašlji. Do poremećaja u odvijanju replikacije može doći djelovanjem niza vanjskih i unutarnjih čimbenika. U vanjske čimbenike koji aktiviraju kontrolnu točku u fazi S ubrajamo agense poput hidroksiureje (inhibitor

ribonukleotid reduktaze) i afidikolina (inhibitor DNA polimeraze). U prepoznavanju zastoja replikacijskih rašlji kod eukariota ključnu ulogu ima pojava jednolančanih segmenata DNA koji se pojavljuju zbog djelovanja helikaza MCM koje nastavljaju odvajati lance DNA i nakon zastoja (Byun i sur., 2005; Sogo i sur., 2002). Na jednolančanu DNA brzo se veže protein RPA, koji izravno veže ATRIP (od engl. *ATR-interacting protein*), regulatornu podjedinicu ATR (Zou, 2007). Još uvijek nije poznat precizan mehanizam aktivacije ATR, no smatra se da je u tom procesu bitna interakcija ATRIP i kompleksa koji se sastoji od Rad9-Rad1-Hus1(9-1-1) i TopBP1 (Kumagai i sur. 2006; Zou i sur., 2003). U stanicama sisavaca ključna efektorska kinaza koja uzrokuje inhibiciju faza inicijacije i elongacije replikacije je Chk1. Kontrolna točka u fazi S izaziva: stabilizaciju zastoja replikacijskih rašlji, inhibiciju inicijacije replikacije na novim ishodištima, inhibiciju ulaska u G2 i M (inaktivacijom Cdc25) te usporavanje postojećih replikacijskih rašlji. Chk1 fosforilira fosfatazu Cdc25A na položaju S123, uzrokujući njezinu razgradnju proteolizom posredovanu kompleksom SCF<sup>βTrCP</sup> čime je onemogućena aktivacija Cdk2 te dolazi do odvajanja Cdc45 od replikacijskog kompleksa (Syljuåsen i sur., 2005). Chk1 može i izravno uzrokovati odvajanje Cdc45 od kromatina neovisno o Cdc25A i Cdk2 (Liu i sur., 2006a).

### **1.2.3.3. Kontrolna točka G2/M**

Glavna zadaća kontrolne točke G2/M je onemogućiti diobu stanica s oštećenom DNA. U slučaju oštećenja DNA tijekom faze S ili G2 dolazi do zastoja u G2/M koji omogućava popravak nastalog oštećenja ili trajnog zaustavljanja stanica. Glavna meta ove kontrolne točke je kompleks ciklin B1-Cdk1, odnosno sprečavanje njegove aktivacije (**Slika 10**). Uslijed oštećenja DNA dolazi do aktivacije ATM/ATR koja zatim fosforilira Chk2, odnosno Chk1 koje fosforilacijom inhibiraju fosfataze iz obitelji Cdc25 onemogućavajući njihovo aktivirajuće djelovanje na kompleks ciklin B1-Cdk1 (Bartek i Lukas, 2003; Chen i Poon, 2008). No, nekoliko neovisnih istraživanja dovelo je u pitanje važnost Chk2 u aktivaciji kontrolne točke G2/M, nasuprot Chk1. U dva neovisna istraživanja pokazano je da je fosforilacija p53, odnosno njegova aktivacija nakon oštećenja DNA neovisna o Chk2 (Ahn i sur., 2003; Jallepalli i sur., 2003; Lossaint i sur., 2011). S druge strane, nekoliko istraživanja ukazalo je na to da bi Chk1 mogla imati ključnu ulogu u regulaciji kontrolne točke G2/M (Syljuåsen i sur., 2006; Jin i sur., 2008; Lossaint i sur., 2011). Prisutnost Chk1, no ne i Chk2, nužna je za razgradnju

Cdc25A putem SCF<sup>BTRCP</sup> nakon genotoksičnog stresa, a omogućena je fosforilacijom Cdc25A na položaju S76 (Jin i sur., 2008). Pojačana ekspresija Chk1 dovela je do odgode izlaska stanica iz zastoja u G2/M, dok je utišavanje Chk1 ubrzalo izlazak stanica iz zastoja (Syljuåsen i sur., 2006). Poznata je još jedna nizvodna meta ATM/ATR koja uključuje kinaze p38MAPK i MK2, te može inhibirati djelovanje Cdc25. Aktivacija ovog puta ide preko kinaza TAO, no još uvijek nisu poznati precizni mehanizmi (Reinhardt i sur., 2007).



**Slika 10: Aktivacija kontrolne točke G2/M.** Brzi odgovor na oštećenje uključuje aktivaciju ATR koja zatim fosforilira Chk1 koja zatim inhibira Cdc25 čime je onemogućena aktivnost kompleksa ciklin B1-Cdk1. Ranije se mislilo da na isti način djeluje i ATM preko Chk2, no niz istraživanja doveo je u pitanje ulogu Chk2 u ovoj kontrolnoj točki. Drugi, sporiji odgovor, za kojeg se prije mislilo da je bitan samo za održavanje zastoja u G2/M uključuje protein p53, koji preko p21 inhibira kompleks ciklin B1-Cdk1. Novija istraživanja pokazala su da je ovaj put od presudne važnosti u izazivanju zastoja u G2/M u normalnim stanicama čovjeka, dok u tumorskim staničnim linijama u kojima je taj signalni put poremećen, ulogu glavnog regulatora preuzima Chk1. p21 također sprečava fosforilaciju pRb, onemogućavajući transkripciju mitotskih regulatora što rezultira izlaskom iz staničnog ciklusa (senescencija). Tijekom zastoja u G2 dolazi do razgradnje mitotskih regulatora zbog preuranjene aktivacije kompleksa APC/C-CDH1.

Osim ovog bržeg odgovora, već je neko vrijeme poznat i sporiji, uključen u održavanje zastoja u G2/M, ovisan o proteinu p53, odnosno p21 (Bunz i sur., 1998; Dulić i

sur., 1998). No, dio istraživanja i dalje je dovodio u pitanje ulogu p21 u ovoj kontrolnoj točki, osobito su postojale dvojbe oko njegove sposobnosti da inaktivira kompleks ciklin B1-Cdk1. Čak i nakon pojačane ekspresije p21 u stanicama U2OS nije došlo do značajnijeg vezanja na kompleks ciklin B1-Cdk1 (Smits i sur., 2000). Konačnu potvrdu uloge proteina p21 u izazivanju zastoja u G2/M dala su istraživanja na normalnim fibroblastima čovjeka (NHF, od engl. *normal human fibroblast*) tretiranim lijekom ICRF-193, koji kao inhibitor topoizomeraze II izaziva specifično zastoje u G2/M. Nakon duljeg izlaganja ICRF-u došlo je do trajnog izlaska stanica iz ciklusa u G2, praćeno smanjenom razinom ciklina A i B1, te inhibicijom fosforilacije pRb. Ovisnost ovog zastoja o p53/p21 i pRb potvrđena je pokusima na stanicama NHF u kojima je zbog pristutnosti virusnih onkoproteina E6 ili E7 poremećena aktivnost p53, odnosno pRb (Baus i sur., 2003). Uz ulogu u održavanju zastoja u G2, eksperimenti na NHF upućivali su na izravnu inhibiciju kompleksa ciklin-Cdk djelovanjem p21. Najprije je pokazano da p21 može izravno blokirati aktivnost kompleksa ciklin A-Cdk1/2 (Baus i sur., 2003), a potom i ciklin B1-Cdk1 zadržavajući ga u jezgri i onemogućavajući njegovu aktivaciju pomoću CAK, Plk1 i Cdc25 u citoplazmi (Charrier-Savournin i sur., 2004). Smanjenje razine mitotskih regulatora tijekom zastoja u G2/M najprije se pripisivalo represiji njihove transkripcije preko hipofosforiliranog pRb. No, otkriveno je da tijekom zastoja u G2/M dolazi do razgradnje mitotskih regulatora uslijed preranog aktiviranja kompleksa APC/C-CDH1, zbog smanjenja razine njegovog inhibitora Emi1 u ovisnosti o p21 (Lee i sur., 2009; Gillis i sur., 2009; Wiebusch i Hagemeier, 2010; Gire i Dulić, 2015; Krenning i sur., 2014).

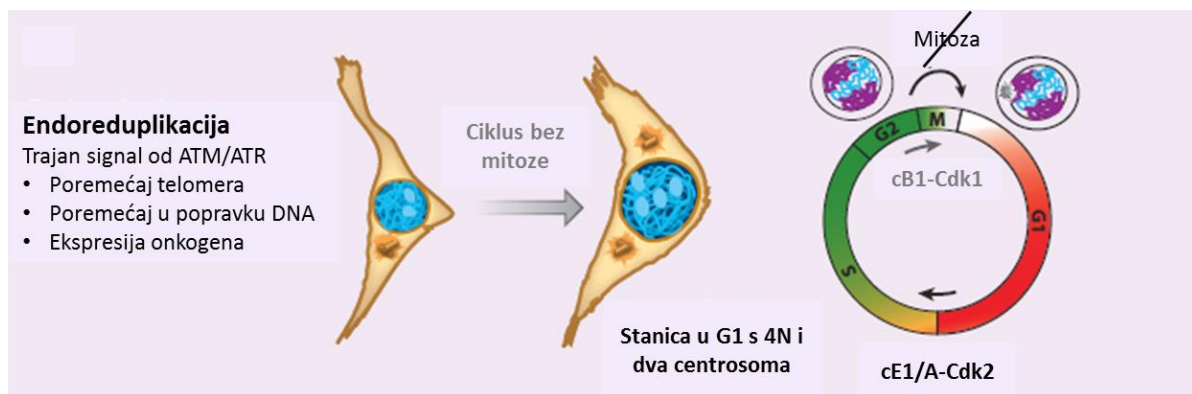
p53 potiče ekspresiju p21 i 14-3-3 $\sigma$  koji sudjeluje u zadržavanju kompleksa ciklin B1-Cdk1 u neaktivnom stanju u citoplazmi (Chan i sur., 1999). Otkriveno je da i Chk1 može blokirati ekspresiju ciklina B1 i Cdk1, sudjelujući u održavanju zastoja u G2 (Shimada i sur., 2008).

Istraživanje provedeno na više različitih normalnih i tumorskih staničnih linija čovjeka s ciljem razjašnjenja uloge p21, Chk1 i Chk2 u izazivanju i održavanju zastoja u G2/M ukazalo je na značajne razlike ovisno o vrsti stanica i oštećenja. U normalnim stanicama najvažniju ulogu u izazivanju i održavanju zastoja u G2/M imaju Chk1 i p21 (no Chk1 nije nužan u prisutnosti p21), dok Chk2 vjerojatno nema značajnu ulogu u ovoj kontrolnoj točki. Nasuprot tome, u tumorskim stanicama u kojima unatoč prisutnosti p53 dolazi do slabe indukcije p21



zbog poremećaja u aktivaciji signalnog puta ATM/p53/p21 neophodna je uloga Chk1, dok Chk2 ni ovdje nije presudan (Lossaint i sur., 2011).

Novija su istraživanja pokazala da, uslijed produljenog zastoja u G2/M, zbog izostanka aktivnosti kompleksa ciklin B1-Cdk1, normalne stanice trajno izlaze iz ciklusa (senescencija) zahvaljujući aktivnosti p53/p21 i pRb (Baus i sur., 2003; Krenning i sur., 2014; Johmura i sur., 2014; Ye i sur., 2013; Gire i Dulić, 2015). Pokazano je da u stanicama u kojima p53 nije aktivan, kronično oštećenje DNA uzrokuje produljenu aktivnost Chk1 i Chk2 što dovodi do “preskakanja” mitoze bez odlaska u senescenciju (Davoli i sur., 2010). Tada stanice dolaze u stanje slično fazi G1, no s tetraploidnim sadržajem DNA. U njima dolazi do razgradnje geminina u ovisnosti o aktivnosti kompleksa APC/C-CDH1, što u odsutstvu p53/p21 omogućava djelovanje Cdt1 na aktivaciju novih replikacijskih kompleksa i novog ciklusa replikacije DNA (endoreduplikacija) (**Slika 11**). Prvi korak u nastanku poliploidije predstavlja tetraploidno stanje u fazi G1. Do pojave tetraploidnosti u fazi G1 može doći na tri moguća načina: fuzijom stanica, poremećajima tijekom mitoze (u metafazi, anafazi ili citokinezi) te endoreduplikacijom. Do endoreduplikacije dolazi u stanicama koje su izložene opetovanom genotoksičnom stresu i/ili nisu u mogućnosti popraviti oštećenje zbog čega ostaju dulje vrijeme zaustavljene u G2/M (Davoli i de Lange, 2011).



**Slika 11: Endoreduplikacija.** Zbog prisutnosti trajnog signala od ATM/ATR (uslijed poremećaja telomera, poremećaja u popravku DNA ili ekspresije onkogen) onemogućena je aktivnost kompleksa ciklin B1-Cdk1 te dolazi do preskakanja mitoze i ulaska stanice u fazu sličnu G1 s tetraploidnim sadržajem DNA. Aktivnost kompleksa ciklin E1-Cdk2 i ciklin A-Cdk2 omogućavaju novi ciklus replikacije DNA što dovodi do poliploidije (preuzeto i prilagođeno prema Davoli i de Lange, 2011).

## 1.3. p73

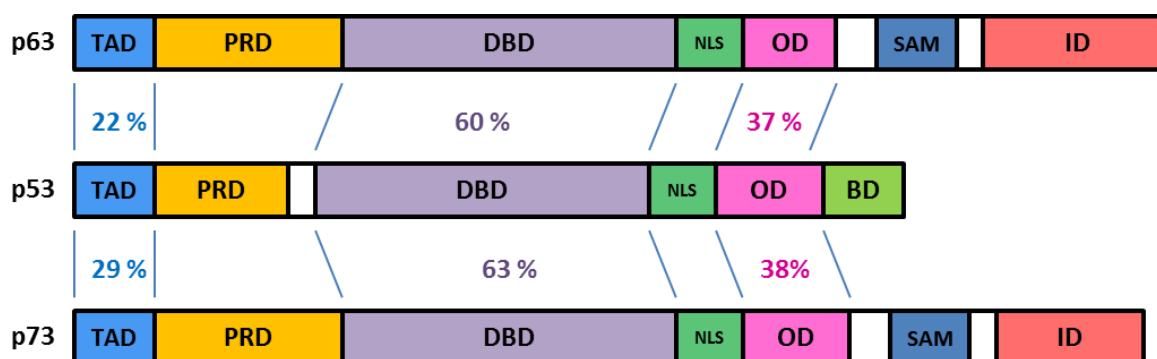
### 1.3.1. p73 je član obitelji tumorskog supresora p53

Protein p53 otkriven je 1979.g. kao jezgri protein koji stupa u interakciju s onkogenim velikim antigenom T virusa SV40 (Lane i Crawford, 1979). Tijekom desetljeća bio je u središtu brojnih istraživanja koja su dovela do važnih spoznaja o njegovoj ključnoj ulozi u staničnom odgovoru na različite oblike stresa. Ovisno o intenzitetu i vrsti nastalog oštećenja, te vrsti stanica, p53 usmjerava stanicu na neki od sljedećih puteva: zastoj staničnog ciklusa, popravak DNA, senescenciju ili programiranu staničnu smrt (apoptozu). p53 je ubrzo prepoznat kao tumorski supresor te je zbog svoje važnosti nazvan „čuvarom genoma“ (Levine, 1997).

Kasnih 90-ih godina prošlog stoljeća otkriveni su proteini p63 i p73, te su na temelju svoje strukturne sličnosti svrstani u obitelj p53 (Kaghad i sur., 1997, Yang i sur., 1998). Proučavanje uloga ovih proteina dovelo je do raznolikih spoznaja. S jedne strane proteini p63 i p73 također pokazuju sposobnost prepoznavanja i vezanja na kanonske elemente koji odgovaraju na p53 i aktivacije niza ciljnih gena čime se u svojoj ulozi djelomično preklapaju sa p53. Nasuprot tome, eksperimenti na mišjim modelima ukazali su na značajne razlike u biološkim ulogama ovih proteina. *p53-knockout* miševi su vijabilni i pokazuju normalan embrionalan razvoj, no umiru u ranoj dobi (do navršenog šestog mjeseca života) zbog razvoja spontanih tumora (Donehower i sur., 1992). S druge strane, iako se rađaju živi, *p73-knockout* miševi obično uginu unutar prva dva mjeseca života od posljedica niza poremećaja u razvoju živčanog, imunološkog te reproduktivnog sustava (Yang i sur., 2000). Najveći poremećaji otkriveni su kod *p63-knockout* miševa koji ugibaju odmah po rođenju što pokazuje da ovaj član obitelji ima najznačajniju ulogu u razvoju, osobito organa epitelnog podrijetla (Mills i sur., 1999). Ono što je bilo osobito neočekivano, prvotni pokusi nisu pokazali veću učestalost tumora kod *p63-* i *p73-knockout* miševa, što je uz rijetku pojavu mutacija ovih dvaju gena poljuljalo sliku o njima kao klasičnim tumorskim supresorima (Mills i sur., 1999; Yang i sur., 2000; Yang i sur., 2002).

### 1.3.1.1. Strukturna obilježja proteina p53, p63 i p73

Sva tri proteina građena su od više funkcionalnih područja, od kojih najveći stupanj sličnosti postoji između tri najvažnija područja (**Slika 12**). To su transaktivacijsko područje (TAD, od engl. *transactivation domain*) na N-kraju, središnje DNA-vezno područje (DBD, od engl. *DNA-binding domain*), te oligomerizacijsko područje (OD, od engl. *oligomerization domain*) na C-kraju proteina (Bénard i sur., 2003). Najveća podudarnost slijeda između tri proteina je u središnjem DNA-veznom području, a također je zanimljivo da p63 i p73 pokazuju veću sličnost međusobno nego u odnosu na p53. Također, sva tri proteina imaju područje bogato prolinom (PRD, od engl. *proline-rich domain*) između TAD i DBD, dok je najveća razlika u građi ovih proteina prisutna na C-kraju. Tako p63 i p73 na C-kraju imaju područje sa sterilnim  $\alpha$ -motivom (SAM, od engl. *sterile  $\alpha$  motif*), a p53 ima bazno područje (BD, od engl. *basic domain*). Između DBD i OD nalazi se signalno područje za smještanje u jezgru (NLS, engl. *nuclear localization signal*). p53 ima dva transaktivacijska područja (TAD1 i TAD2), dok p63 i p73 imaju jedno transaktivacijsko područje (TAD1), a na C-kraju imaju i inhibitorno područje (ID, od engl. *inhibitory domain*) (Scoumanne i sur., 2005).



**Slika 12: Usporedna struktura gena p53, p63 i p73 koja prikazuje najvažnija područja.** Sva tri gena građena su od transaktivacijskog područja (TAD, od engl. *transactivation domain*) na N-kraju, središnjeg DNA-veznog područja (DBD, od engl. *DNA-binding domain*) te oligomerizacijskog područja (OD, od engl. *oligomerization domain*) na C-kraju. Između TAD i DBD nalazi se područje bogato prolinom (PRD, od engl. *proline-rich domain*), a između DBD i OD nalazi se signalno područje za smještanje u jezgru (NLS, od engl. *nuclear localization signal*). Geni p63 i p73 na C-kraju još sadrže i područje sa sterilnim  $\alpha$  motivom (SAM, od engl. *sterile  $\alpha$  motif*) te inhibitorno područje (ID, od engl. *inhibitory domain*). Prikazan je i postotak sličnosti slijeda između određenih područja pojedinih gena.

Sličnost u strukturi i organizaciji ovih triju proteina očituje se i u postojanju većeg broja različitih izoformi. Sva tri gena posjeduju dva promotora što uz alternativno izrezivanje na C- i N-kraju otvara mogućnost postojanja velikog broja različitih izoformi od kojih je veći dio detektiran na razini mRNA i/ili proteina.

### **1.3.1.2. Funkcionalna sličnost između članova obitelji p53**

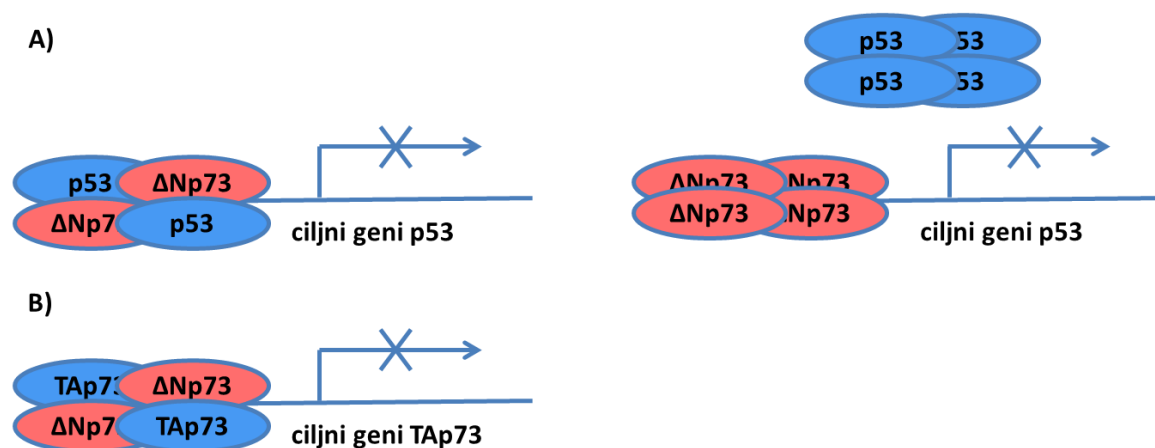
Unatoč početnim nejasnoćama oko važnosti proteina p63 i p73 u supresiji tumora (na temelju prvotnih istraživanja na *knockout*-miševima) s vremenom su otkrivene njihove brojne više ili manje podudarne uloge u različitim staničnom procesima. Uz kontrolu stanične sudbine, supresiju tumora te razvoj, pronađene su uloge u nizu staničnih procesa poput reprodukcije, popravka, održavanja i rekombinacije genoma, metabolizma, starenja, epigenetskih promjena itd. S obzirom na složenu posttranslacijsku regulaciju svih triju proteina te još uvijek nedovoljno poznavanje stvarnih hijerarhijskih odnosa između pojedinih izoformi u djelovanju na određene procese, primjena spoznaja o ovim proteinima u kliničkom liječenju pacijenata još uvijek je ograničena (Costanzo i sur., 2014).

p53 djeluje kao transkripcijski faktor u regulaciji niza gena uključenih u različite stanične procese: zastoj staničnog ciklusa (*p21* i *14-3-3 $\sigma$* ), popravak DNA (*GADD45* i *p53R2*), apoptozu (*IGFBP3*, *Bax*, *DR5*, *PUMA* i *Noxa*), te autoregulaciju (*MDM2*) (el-Deiry, 1998; Harms i sur., 2004). Pokazalo se da i p63 i p73 mogu djelovati kao transkripcijski faktori djelomično se preklapajući s p53 u aktiviranju transkripcije istih ciljnih gena. Sposobnost regulacije specifičnih ciljnih gena temelji se na sličnostima koje postoje u strukturi svih triju proteina.

### **1.3.2. Izoforme proteina p73**

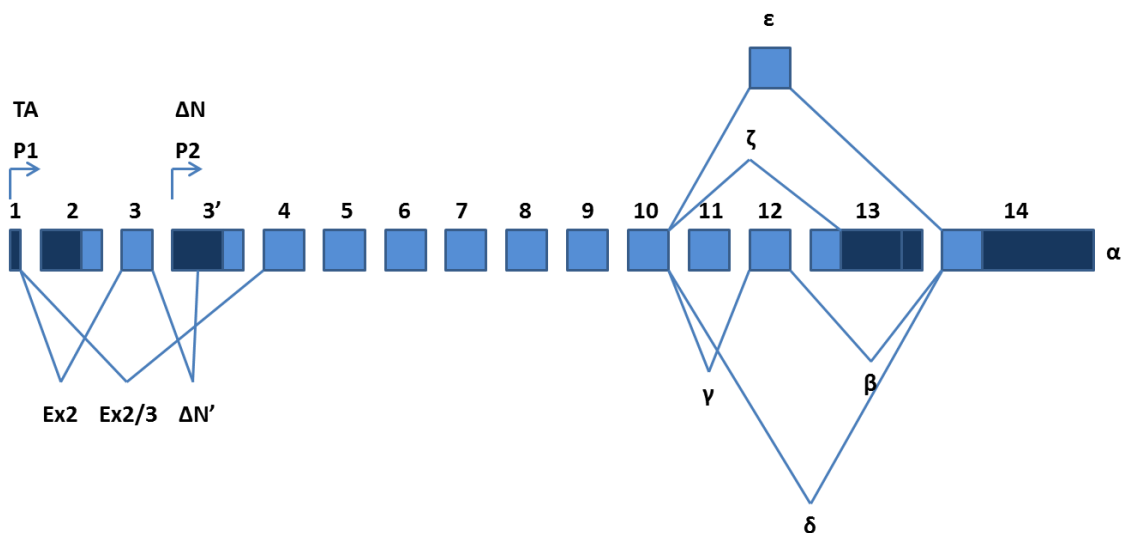
Protein p73 kod čovjeka kodiran je genom *TP73* smještenim na kromosomu 1p36.3, u području koje je često u tumorima podložno deleciji (Kaghad i sur., 1997). Spomenuta je njegova još uvijek kontroverzna uloga u tumorigenezi koja se dijelom može objasniti postojanjem mnogobrojnih proteinskih izoformi. Brojne izoforme mogu se na temelju korištenja dvaju različitih promotora, odnosno s obzirom na prisutnost/cjelovitost TAD na N-kraju podijeliti na dvije glavne skupine: transkripcijski aktivne izoforme TAp73 te proto-

onkogene izoforme  $\Delta TA$  ili  $\Delta Np73$ . Prve imaju cjelovito transaktivacijsko područje te mogu aktivirati niz ciljnih gena djelujući slično proteinu p53 te se smatraju tumorskim supresorima. Za razliku od njih, izoforme  $\Delta Np73$  djeluju kao dominantno-negativni inhibitori proteina p53, TAp63 i TAp73, što ih čini potencijalnim onkogenima. Svoje inhibitoryno djelovanje  $\Delta Np73$  ostvaruju izravnim natjecanjem u vezanju za promotore ciljnih gena i/ili stvaranjem neaktivnih heterotetramera koji nemaju sposobnost aktivacije transkripcije ciljnih gena (**Slika 13**) (Zaika i sur., 2002; Stiewe i sur., 2002). Pokazano je da izoforma  $\Delta Np73\alpha$ , te u manjoj mjeri i  $\Delta Np73\beta$ , može dovesti do nakupljanja, odnosno stabilizacije TAp73 $\alpha$  i TAp73 $\beta$  istodobno inhibirajući njihovo transaktivacijsko djelovanje (Slade i sur., 2004). Danas je poznato da i različite izoforme proteina p53 mogu stvarati komplekse s TAp73 i inaktivirati ga, ukazujući na složenu mrežu međudjelovanja između različitih izoformi članova ove obitelji u regulaciji važnih staničnih procesa (Zorić i sur., 2013).



**Slika 13: Izoforme  $\Delta Np73$  kao dominantno-negativni inhibitori proteina p53 i TAp73.** Svoje djelovanje izoforme  $\Delta Np73$  ostvaruju vezanjem na promotore ciljnih gena u obliku neaktivnih heterotetramera (u slučaju inhibicije p53 i TAp73) odnosno kompeticijom u vezanju na promotore u obliku  $\Delta Np73$ -tetramera (češće u slučaju inhibicije p53).

Na N-kraju postoji i mogućnost alternativnog izrezivanja pa tako nastaju još tri moguće izoforme (p73 $\Delta ex2$ , p73 $\Delta ex2/3$  i  $\Delta N'p73$ , pri čemu  $\Delta N'p73$  u konačnici rezultira istim proteinskim produktom kao i izoforma  $\Delta Np73$  koja se prepisuje od promotora P2) (Kaghad i sur., 1997; Ishimoto i sur., 2002; Stiewe i sur., 2002a; Stiewe i sur., 2002b). Alternativno izrezivanje prisutno je i na C-kraju (izoforme  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) što na kraju daje konačni broj od 35 mogućih mRNA odnosno teoretski 29 različitih proteinskih izoformi od kojih je samo dio uistinu pronađen u stanicama ili tkivima (**Slika 14**).



**Slika 14: Struktura gena p73.** Prikazan je način nastanka različitih izoformi korištenjem dvaju različitih promotora (P1 i P2), te alternativnim izrezivanjem na C- i N-kraju. Brojevi označavaju pojedine eksone, svjetloplavom bojom označene su kodirajuće, a tamnoplavom nekodirajuće regije gena.

### 1.3.3. Regulacija aktivnosti gena/proteina p73

Regulacija aktivnosti p73 moguća je na razini transkripcije, translacije i posttranslacije (opširno prikazano u Slade i Horvat, 2011). Za aktivaciju transkripcije gena *TP73* najvažniji je transkripcijski čimbenik E2F1 koji se veže na promotor P1 pojačavajući njegovu transkripciju čime izravno utječe na razinu proteina p73 u stanici nakon oštećenja DNA (Stiewe i Pützer, 2000). Djelovanje E2F1 na aktivaciju promotora p73 potaknuto je djelovanjem kinaza Chk1 i Chk2 koje fosforiliraju i aktiviraju, odnosno stabiliziraju E2F1 u različitim staničnim linijama nakon oštećenja DNA (Urist i sur., 2004). Aktivacija p73 događa se i nakon pojačane ekspresije onkogeno poput c-Myc i E1A izazivajući apoptozu u odsutnosti p53 (Zaika i sur., 2001). Nasuprot tome, u negativnoj regulaciji sudjeluju dva represora: ZEB1 (od engl. *zinc finger E-box binding homeobox*) (Fontemaggi i sur., 2001) te cEBP $\alpha$  (Marabese i sur., 2003). Dodatni oblik negativne regulacije p73 predstavlja hipermetilacija promotora često uočena u slučajevima akutne limfoblastične leukemije i Burkittovog limfoma (Corn i sur., 1999).

Kontrola aktivnosti proteina p73 posttranslacijskim modifikacijama još je složenija te uključuje niz čimbenika, najčešće različitih kinaza uključenih u mehanizme odgovora na oštećenje DNA. Prvo je otkriveno djelovanje ne-receptorske tirozinske kinaze c-Abl (engl.

*cellular Abelson leukemia*) koja stabilizira p73 fosforilacijom na položaju Y99 (te u manjoj mjeri na 121 i 240) nakon djelovanja cisplatine i ionizirajućeg zračenja čime uzrokuje njegovo nakupljanje u stanici i pojačava apoptozu (Gong i sur., 1999; Agami i sur., 1999; Yuan i sur., 1999; Yuan i sur., 1997; Tsai i Yuan, 2003). Za aktivaciju c-Abl potrebna je kinaza ATM, dok je aktivna c-Abl zatim uključena u aktivaciju ATM i ATR (Wang i sur., 2011). Uz ranije navedeno djelovanje Chk1 i Chk2 preko E2F1 na razinu p73, kinaza Chk1 izravno fosforilira TAp73 $\alpha$  na položaju S47 aktivirajući ga nakon oštećenja DNA i uzrokujući apoptozu (Gonzalez i sur., 2003). Slično, proteinska kinaza C $\delta$  (PKC $\delta$ ) fosforilira p73 na položaju S289, na taj način također pojačavajući apoptozu (Ren i sur., 2002). Nasuprot tome, Cdk fosforiliraju p73 na položaju T86 osobito u fazi G2/M staničnog ciklusa inaktivirajući ga čime omogućavaju daljnji tijek staničnog ciklusa (Fulco i sur., 2003; Gaiddon i sur., 2003).

Unatoč sposobnosti E2F1 da potiče transkripciju gena p73, pronađeno je da egzogena ekspresija E2F1 u stanicama HeLa i H1299 dovodi do smanjenja razine proteina p73 $\alpha$ , što je dovelo do zaključka da E2F1 potiče proteasomalnu razgradnju proteina p73 (Ozaki i sur., 2009).

### **1.3.4. Uloga proteina p73 u tumorigenezi**

Na temelju njegove velike strukturne sličnosti s tumorskim supresorom p53, od proteina p73 se odmah po otkriću očekivalo slično djelovanje. No, za razliku od p53 čije mutacije predstavljaju jednu od najčešćih promjena u različitim tumorima čovjeka, mutacije p73 iznimno su rijetke. Visoka ekspresija ovog proteina u brojnim tumorima čovjeka i povezanost s lošom prognozom oboljelih poljuljale su sliku o p73 kao klasičnom tumorskom supresoru (Tannapfel i sur., 1999; Levrero i sur., 2000; Yuan i sur., 1999; Sun, 2002). Spoznaja o postojanju više izoformi ovog proteina te razvoj specifičnih početnica za njihovo razlikovanje na razini mRNA pokazala su da se najčešće radi o povišenoj razini izoformi  $\Delta$ Np73 (Zaika i sur., 2002; Stiewe i sur., 2002b; Concin i sur., 2004).

#### **1.3.4.1. Uloga izoformi TAp73**

Izoforme TAp73 poput p53 sprečavaju proliferaciju i potiču apoptozu što ih čini ključnima za učinkovitost djelovanja kemoterapeutika. TAp73-*knockout* miševi pokazali su

sklonost razvoju tumora te osjetljivost na djelovanje karcinogena čime je potvrđeno tumor supresorsko djelovanje TAp73 (Tomasini i sur., 2008). Budući da TAp73 pokazuju tumor supresorsko djelovanje, a mutacije p73 su iznimno rijetke, ove izoforme bi mogle biti zanimljive mete u liječenju tumora. Stoga je iznimno važno upoznati mehanizme njihove inaktivacije do kojih dolazi u pojedinim tumorima i tumorskim staničnim linijama. Dosada su poznata dva glavna mehanizma inaktivacije TAp73: stvaranje kompleksa s inhibitornim proteinima bilo da se radi o članovima vlastite obitelji ( $\Delta Np73$ ,  $\Delta Np63$  ili mt p53) ili nekim drugim čimbenicima, uglavnom već poznatima zbog uključenosti u regulaciju proteina p53 (MDM2, iASPP, mTOR) te epigenetsko utišavanje pojačanom metilacijom promotora *TP73*, otkriveno u malignim limfoproliferativnim poremećajima (Maas i sur., 2013).

p53 ima ključnu ulogu u staničnom odgovoru na oštećenje DNA sudjelujući u popravku DNA te izazivajući zastoj staničnog ciklusa ili apoptozu. No, budući da je p53 mutiran u mnogim tumorima i tumorskim linijama čovjeka, koje unatoč tome pokazuju osjetljivost na kemoterapiju, postavilo se pitanje o čimbenicima koji sudjeluju u tim procesima u nedostatku funkcionalnog p53. Početna istraživanja proteina p73 nisu ukazivala na njegovu ulogu u staničnom odgovoru na oštećenje DNA (Kaghad i sur., 1997). Zatim su uslijedila otkrića koja su pokazala indukciju p73 kao odgovor na ograničeni broj lijekova (cisplatina i adriamicin) koja oštećuju DNA i koriste se u kemoterapiji (Agami i sur., 1999; Gong i sur., 1999; Yuan i sur., 1999; Costanzo i sur., 2002). Irwin i suradnici prvi su pokazali indukciju TAp73 (TAp73 $\alpha$ , te u manjoj mjeri TAp73 $\beta$ ) kao odgovor na tretman većim brojem različitih kemijskih agensa koji se koriste u terapiji tumora, te ukazali na njegovu važnost u otpornosti tumora na terapiju. Blokiranjem aktivnosti ili ekspresije TAp73 pomoću dominantno-negativnih mutanta p73DD, siRNA ili homolognom rekombinacijom dolazi do pojačane otpornosti tumorskih stanica na kemoterapeutike, odnosno inhibicije apoptoze, neovisno o statusu p53. Snižavanjem razine mutiranih oblika p53, za koje je otprije bilo poznato kako inaktiviraju p73 (Blandino i sur., 1999; Di Como i sur., 1999; Gaiddon i sur., 2001; Li i sur., 1998; Marin i sur., 2000), dolazi do pojačane osjetljivosti na kemoterapeutike (Irwin i sur., 2003).



### 1.3.4.2. Uloga izoformi $\Delta Np73$

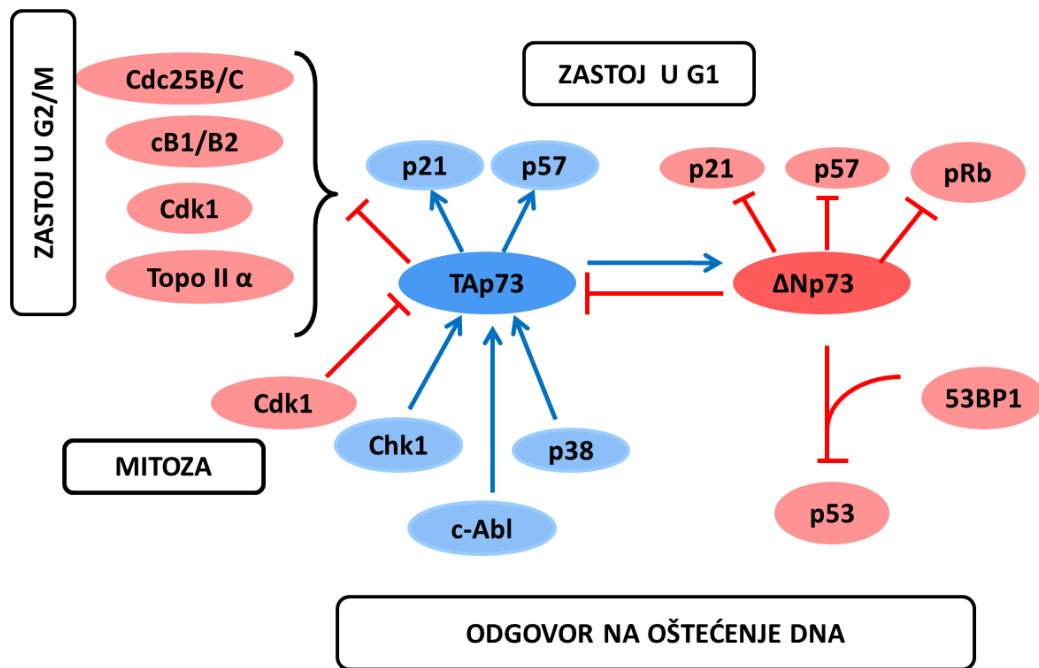
Prva studija koja je razlikovala izoforme TAp73 i  $\Delta Np73$  pokazala je pojačanu ekspresiju endogene izoforme  $\Delta Np73\alpha$  na razini mRNA i proteina u nizu primarnih tumora čovjeka u odnosu na pripadajuća zdrava tkiva (Zaika i sur., 2002). Pokusi na nekoliko tipova tumorskih staničnih linija pokazali su da  $\Delta Np73\alpha$  djeluje kao dominantno-negativni inhibitor p53 i TAp73 putem dvaju mogućih mehanizama: stvaranjem transkripcijski neaktivnih heterotetramera ili kompeticijom za vezanje na promotore ciljnih gena. Na taj način  $\Delta Np73\alpha$  blokira djelovanje p53 i TAp73 u nizu različitih procesa kao što su stanični ciklus, diferencijacija ili apoptoza (Zaika i sur., 2002). Ista skupina znanstvenika potvrdila je onkogeno djelovanje  $\Delta Np73\alpha$  u eksperimentima na primarnim stanicama miša i *in vivo*. Ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  u embrionalnim fibroblastima miša (MEF, od engl. *mouse embryonic fibroblast*) dovodi do otpornosti na spontano replikativno starenje, čime omogućava njihovu imortalizaciju. Otkrivena je i sposobnost suradnje  $\Delta Np73\alpha$  s onkoproteinom Ras u transformaciji primarnih stanica, te induciranja fibrosarkoma nakon injektiranja stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u miševu (Petrenko i sur., 2003). U simpatičkim neuronima miša pojačana je ekspresija izoforme  $\Delta Np73$  koja sprečava staničnu smrt izazvanu djelovanjem p53 i TAp73 (Pozniak i sur., 2000; Yang i sur., 2000). Ekspresija  $\Delta Np73$  povezana je i sa smanjenom učestalosti apoptoze *in vivo*, te je marker lošije prognoze kod pacijenata oboljelih od neuroblastoma, neovisno o dobi, položaju primarnog tumora, stadiju, prisutnosti delecije na položaju 1p i amplifikacije gena MYCN (Casciano i sur., 2002). Studija na karcinomu jajnika koja je analizirala razinu mRNA različitih izoformi  $\Delta Np73$  ( $\Delta Np73$ ,  $\Delta N'p73$ , Ex2p73 i Ex2/3p73) pokazala je pojačanu ekspresiju izoforme  $\Delta N'p73$  kod većine ispitanih tumora u odnosu na pripadajuća zdrava tkiva. Osim toga, u ovoj studiji uočena je povezanost između razine ekspresije različitih izoformi  $\Delta Np73$  i p53. Tumori s ekspresijom p53 divljeg tipa imali su višu ekspresiju različitih izoformi  $\Delta Np73$ , u usporedbi s tumorima u kojima je p53 mutiran, što upućuje na smanjenje selekcijskog pritiska na mutaciju p53 u tumorima (Concin i sur., 2004). Ista skupina znanstvenika prva je pokazala da izoforme  $\Delta Np73$  djeluju na otpornost na lijekove *in vivo*, pogoršavajući odgovor na tretman cisplatinom i općenito preživljenje u bolesnika s mutiranim p53 (Concin i sur., 2005). Liu i suradnici otkrili su pojačanu ekspresiju TAp73 i  $\Delta Np73\alpha$  u karcinomu pločastih stanica

cerviksa, i ustanovili da su razine ekspresije ovih izoformi u inverznom odnosu. Također, pojačana ekspresija izoforme  $\Delta Np73\alpha$  pronađena je u tumorima otpornijima na zračenje i povezana s lošijim ishodom bolesti, dok je izoforma TAp73 $\alpha$  pronađena u tumorima osjetljivijima na zračenje (Liu i sur., 2006). Druga skupina znanstvenika pokazala je onkogeno djelovanje izoforme  $\Delta Np73\beta$  u procesu karcinogeneze stanica jetre *in vivo* u miševima (Tannapfel i sur., 2008).

Međutim, onkogeno djelovanje izoformi  $\Delta Np73$  dovedeno je u pitanje rezultatima koji su ukazali na ovisnost o korištenom modelu ili pristupu istraživanja. Pokazano je da egzogena ekspresija  $\Delta Np73\beta$  u tumorskim staničnim linijama H1299 i MCF-7 može transaktivirati neke od ciljnih gena proteina p53, te na taj način spriječiti proliferaciju putem zastoja staničnog ciklusa ili apoptoze, dok  $\Delta Np73\alpha$  ne pokazuje isto djelovanje u istim staničnim modelima i uvjetima (Liu i sur., 2004a). Nadalje, u dva nezavisna istraživanja pokazano je da inducibilna ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  u nekoliko različitih tumorskih staničnih linija čovjeka s različitim statusom proteina p53 ne dovodi do agresivnijeg tumorskog fenotipa, bržeg rasta broja stanica ni slabijeg odgovora na određene tretmane koji oštećuju DNA (Marabese i sur., 2005; Marrazzo i sur., 2006).

### **1.3.5. Uloga p73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA**

Protein p53 zauzima središnje mjesto u signalnim putovima kontrole staničnog ciklusa u različitim stresnim uvjetima, osobito u odgovoru na oštećenje DNA. Tijekom godina prikupljeni su dokazi o sudjelovanju proteina p73 u nekim od tih procesa djelujući ovisno ili neovisno o p53. Zbog njihovog različitog, često suprotnog djelovanja, uloge izoformi TAp73 i  $\Delta Np73$  prikazat ćemo zasebno. Pritom treba napomenuti kako je mnogo više istraživanja bilo usmjereno na utjecaj tumor supresorskih izoformi TAp73 što je rezultiralo i boljim poznavanjem njihove uloge u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA (**Slika 15**).



Slika 15: Uloga proteina p73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA. Uloge izoformi TAp73 i ΔNp73 prikazane su odvojeno.

### 1.3.5.1. Uloga TAp73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA

U skladu s njihovim tumor supresorskim djelovanjem, izoforme TAp73 u nizu istraživanja pokazale su sposobnost izazivanja zastoja staničnog ciklusa u fazi G1, prijelazu G2/M, te specifičnu ulogu u mitozu i fazi S. Izoforme TAp73 izazivaju zastoje u fazi G1 aktivirajući transkripciju gena *p21* i *p57<sup>Kip2</sup>* (Allocati i sur., 2012). Eksperimenti na različitim staničnim linijama pokazali su da ektopično eksprimirana izoforma TAp73β aktivira transkripciju gena *p57<sup>Kip2</sup>*, dok isto ne vrijedi za ostale izoforme TAp73 kao ni p53. Budući da je poznata važnost *p57<sup>Kip2</sup>* tijekom embrionalnog razvoja, ova spoznaja bi mogla doprinijeti rasvjetljavanju uloge izoforme TAp73β u normalnom razvoju organizma (Balint i sur., 2002). Ektopična ekspresija TAp73 djeluje represivno na promotore gena bitnih za prolazak kontrolne točke G2/M (Cdc25B, Cdc25C, Cdk1, ciklina B1, B2 i topoizomeraze IIα) izazivajući zastoje u ovoj kontrolnoj točki (Scian i sur., 2008; Allocati i sur., 2012). Nasuprot tome, nedavno je pokazano da p73 surađuje s kompleksom FLASH (od engl. *fllice association huge*

*protein*) važnim u transkripciji gena histona, osobito tijekom embrionalnog razvoja, te je nužan za odvijanje staničnog ciklusa (De Cola i sur., 2011).

Posebno je zanimljiv niz istraživanja koja su ukazala na važnu ulogu izoformi TAp73 u održavanju genomske integriteta. Istraživanja na TAp73-*knockout* MEF ukazala su na presudnu ulogu TAp73 u sprečavanju poliploidije i aneuploidije u odsutnosti p53 (Talos i sur., 2007). Također, TAp73-*knockout* miševi pokazali su porast genomske nestabilnosti uz pojavu aneuploidije (Tomasini i sur., 2008).

### **1.3.5.2. Uloga $\Delta$ Np73 u kontroli staničnog ciklusa i odgovoru na oštećenje DNA**

Ubrzo nakon njihovog otkrića, otkriveno je djelovanje izoformi  $\Delta$ Np73 na određene regulatore staničnog ciklusa. Eksperimenti na NHF i tumorskim staničnim linijama ukazali su na inaktivirajuće djelovanje egzogenog  $\Delta$ Np73 $\beta$  na pRb, neovisno o p53. U istom istraživanju pokazano je da ektopična ekspresija  $\Delta$ Np73 $\beta$  potiče proliferaciju NHF uzgajanih bez seruma (Stiewe i sur., 2003). Ista skupina autora je u istraživanju utjecaja ektopične ekspresije  $\Delta$ Np73 $\beta$  na proces karcinogeneze u jetri miševa *in vivo* uz porast razine hiperfosforiliranog pRb, utvrdila i porast ekspresije ciklina D1 i E, odnosno smanjenje razine p21 i 14-3-3 $\sigma$  (Tannapfel i sur., 2008).

U novije vrijeme, eksperimenti provedeni na  $\Delta$ Np73-*knockout* MEF ukazali su na zanimljivu novu ulogu  $\Delta$ Np73 u odgovoru na oštećenje DNA. Naime,  $\Delta$ Np73-*knockout* MEF pokazivali su višu razinu fosforiliranog p53 i ATM nakon djelovanja različitih agensa koji oštećuju DNA, u odnosu na MEF divljeg tipa. To je potvrđeno u stanicama U2OS utišavanjem ekspresije  $\Delta$ Np73 pomoću siRNA. Nadalje, eksperimenti na više staničnih linija pokazali su da  $\Delta$ Np73 $\beta$  (no ne i  $\Delta$ Np73 $\alpha$ ) inhibira aktivaciju p53 direktnom interakcijom sa 53BP1, blokirajući na taj način prijenos signala od mjesta oštećenja DNA do drugih regulatora koji sudjeluju u odgovoru na oštećenje. To bi moglo doprinijeti razumijevanju pojačane otpornosti na kemoterapiju kod tumora s pojačanom ekspresijom izoformi  $\Delta$ Np73 (Wilhelm i sur., 2010).

Povećana učestalost tetraploidije pronađena nakon ektopične ekspresije  $\Delta$ Np73 $\beta$  u tumorskoj staničnoj liniji H1299 ukazuje na moguću ulogu ovih izoformi u održavanju genomske stabilnosti (Marrazzo i sur., 2009). U drugom istraživanju na staničnoj liniji SAOS2,

koja nema eksprimiran p53 ni pRb, ektopična ekspresija izoforme TAp73 $\alpha$  dovela je do porasta učestalosti poliploidije nakon tretmana kolcemidom (inhibitorom diobenog vretena), dok izoforme  $\Delta$ Np73 nisu pokazale isto djelovanje. Spomenuta istraživanja pokazala su da je uloga ovih izoformi u održavanju genomske stabilnosti, osobito nakon oštećenja DNA, ovisna o staničnom modelu te uvjetima, no svakako predstavlja zanimljivo područje za buduća istraživanja.

## 2. CILJ RADA

Pojačana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  pronađena je u različitim tipovima tumora i tumorskih staničnih linija čovjeka, i povezana je s pojačanom otpornošću na kemoterapeutike i zračenje te općenito lošijom prognozom. Cilj ovog istraživanja bio je detaljnije istražiti mehanizme kojima  $\Delta Np73\alpha$  ostvaruje svoju onkogenu ulogu. Naša hipoteza bila je zasnovana na pretpostavci da povišena razina  $\Delta Np73\alpha$  doprinosi zaobilazanju kontrolnih točaka staničnog ciklusa, sudjelujući na taj način u procesu tumorigeneze. U skladu s tom hipotezom, smatrali smo da bi pojačana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  mogla negativno utjecati na aktivnost glavnih regulatora uključenih u kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA. Ovim radom željeli smo ispitati hoće li ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  u normalnim i tumorskim stanicama poremetiti, odnosno spriječiti zastoj staničnog ciklusa uzrokovan oštećenjem DNA i dovesti do aberantnih pojava vezanih uz tumorigenezu.

Ciljevi ovog istraživanja su bili:

- Ispitati utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na tijek staničnog ciklusa u normalnim i tumorskim staničnim linijama nakon genotoksičnog stresa metodom protočne citometrije. Oštećenje DNA izazvali smo  $\gamma$ -zračenjem, bleomicinom (radiomimetik) te ICRF-om, inhibitorom topoizomeraze II koji specifično uzrokuje zastoj u G2 (Downes i sur., 1994; Baus i sur., 2003). Osim korištenjem ICRF-a, detaljnije ispitivanje uloge  $\Delta Np73\alpha$  u kontrolnoj točki G2/M proveli smo na stanicama koje su prethodno sinkronizirane u fazi G1/S, te ozračene tijekom faze S.
- Ispitati moguću sposobnost stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  da prevladaju zastoj staničnog ciklusa uzrokovan oštećenjem DNA metodom protočne citometrije i analizom ugradnje bromodeoksiuridina (BrdU).
- Usporediti proteinske ekspresije glavnih regulatora staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA između stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica metodom Western blot te imunofluorescencijom.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Stanične linije i rad sa staničnim kulturama *in vitro*

Istraživanja smo proveli na normalnim fibroblastima čovjeka NHF (od engl. *normal human fibroblast*), fibroblastima čovjeka s eksprimiranim onkoproteinom E6 humanog papilomavirusa HPV E6 (NHF-E6) (Baus i sur., 2003) te staničnoj liniji osteosarkoma čovjeka U2OS (dostupnoj u bazi *American Type Culture Collection*, ATCC® pod imenom HTB-96™, Manassas, USA). Stanice Phoenix A (ΦA) (dobivene ljubaznošću dr. sc. U. Moll, SUNY Stony Brook, SAD) korištene su kao pakirajuće stanice za proizvodnju rekombinantnih retrovirusa.

Sve korištene stanične linije su adherirajuće, tj. rastu pričvršćene za podlogu i uzgajaju se u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco, Life Technologies, SAD) uz dodatak 10% seruma fetusa goveda, FBS (od engl. *fetal bovine serum*; Sigma, Njemačka), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, SAD), 1 mM natrijevog piruvata (Gibco, Life Technologies, SAD), 100 µg/mL streptomicina (Life technologies, SAD) te 100 U/mL penicilina (Life technologies, SAD). Stanice smo uzgajali u sterilnim plastičnim Petrijevim posudama ili bocama za uzgoj kultura stanica (Sarstedt, Njemačka) u inkubatoru za uzgoj stanica (Kambič, Slovenija) pri 37°C u atmosferi zasićenoj vlagom i u prisutnosti 5% CO<sub>2</sub>. Svaka 2-3 dana stanice smo isprali fosfatnim puferom, PBS bez Ca i Mg (od engl. *phosphate buffer saline*) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, pH 7,4) te odvojili od podloge djelovanjem tripsina (0,25%-tna otopina; Gibco, SAD) uz dodatak 1 mM EDTA, te razrijedili u odgovarajućem omjeru ovisno o vrsti stanica. Višak stanica zamrzavali smo u podlozi za zamrzavanje (45% FBS, 45% tekuće hranjive podloge DMEM, 10% DMSO) te dugoročno pohranjivali u spremniku s tekućim dušikom. Periodično smo provjeravali prisutnost mikoplazmi u staničnim kulturama metodom PCR korištenjem početnica specifičnih za mikoplazme.

### 3.1.1. Tretman agensima koji oštećuju DNA

Oštećenje DNA izazvali smo izlaganjem stanica bleomicinu u koncentraciji 10 µg/ml, ICRF-193, bis(2,6-dioksopiperazin) (Sigma, Njemačka) u koncentraciji 2 µg/ml te  $\gamma$ -zračenju različitih doza (izvor  $^{60}\text{Co}$ , IRB).

### 3.1.2. Sinkronizacija stanica u fazi G1/S

Stanice NHF i NHF-E6 najprije smo predsinkronizirali u G0 uzgajanjem u uvjetima kontaktne inhibicije (potpune popunjenosti podloge na kojoj rastu) tijekom 2 dana. Zatim smo ih razrijedili te nakon 12 sati (kada se stanice nalaze u fazi G1) izložili djelovanju hidroksiureje (Sigma, Njemačka) u koncentraciji 2 mM tijekom 12 sati. Nakon toga smo stanice isprali 2 puta po 10 min u PBS-u i jednom u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM. Uzorke smo sakupljali u određenim vremenskim razdobljima nakon uklanjanja hidroksiureje i analizirali raspodjelu stanica po fazama ciklusa protočnom citometrijom.

## 3.2. Retrovirusna infekcija normalnih i tumorskih staničnih linija

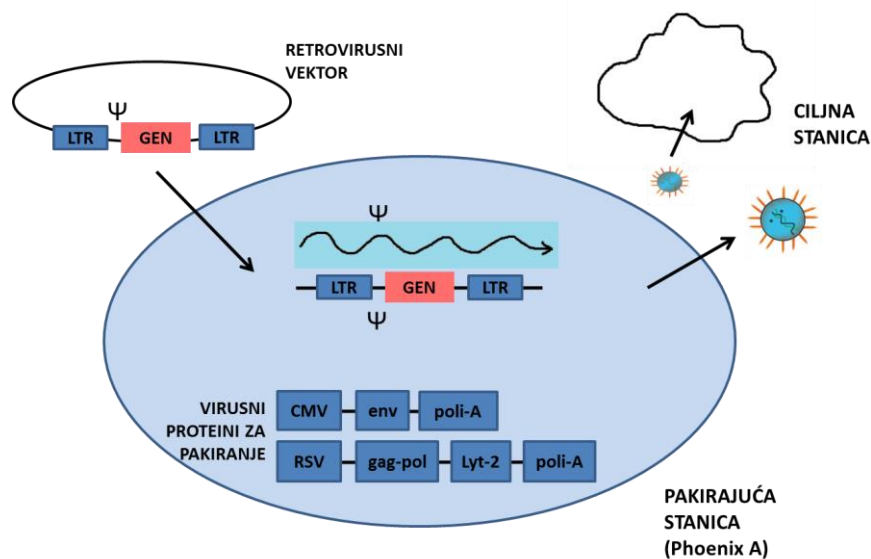
Ektopičnu ekspresiju izoforme  $\Delta\text{Np73}\alpha$  u odabranim staničnim linijama postigli smo retrovirusnom infekcijom. Retrovirusi spadaju u skupinu RNA virusa, a omogućavaju najjednostavniji i najbrži način postizanja stabilne ektopične ekspresije gena u nizu različitih ciljnih staničnih linija sisavaca. Najstariji su korišteni prijenosnici u genskom liječenju.

Životni/replikacijski ciklus retrovirusa započinje vezanjem glikoproteina ovojnice virusa (Env) na specifične receptore na površini stanice, spajanjem membrana nakon čega sadržaj virusne čestice ulazi u stanicu. Nakon razgradnje virusne kapside, virusni enzim reverzna transkriptaza prepisuje virusni genom, RNA u dvolančanu DNA. Virusna DNA ulazi u jezgru stanice i ugrađuje se nasumično u stanični genom. Ugrađeni virusni genom prepisuje se poput staničnih gena te ostaje stabilan i uslijed dioba stanice. Cjelovita mRNA može se upakirati u nove virusne čestice, koje nastaju pupanjem iz stanice domaćina pri čemu nose dio vanjske lipidne membrane s umetnutim glikoproteinskim šiljcima građenim od virusnog proteina Env (Boris-Lawrie i Temin, 1993). U genomu retrovirusa nalaze se tri skupine gena: *gag* (od engl. *group specific antigenes*) za proteine virusne nukleokapside, *pol* za virusnu



reverznu transkriptazu i endonukleazu, te *env* za glikoproteine virusne ovojnice koji se ugrađuju u membranu stanice domaćina.

Za prijenos željenih gena u ciljne stanice retrovirusima koriste se dvokomponentni sustavi koje čine pakirajuće stanice i virusni prijenosnici. Retrovirusi koji se koriste u ovu svrhu su replikacijski defektni, budući da nemaju sposobnost daljnjeg umnažanja nakon unosa gena u ciljnu stanicu. Iz genoma retrovirusa izbace se tri skupine virusnih gena i zamijene genom koji se želi unijeti u ciljnu stanicu. U genomu retrovirusa ostaju jedino slijedovi za upravljanje reverznom transkripcijom, oni nužni za pravilnu i reproducibilnu ugradnju virusnog genoma u kromosom ciljne stanice, te slijed  $\psi$  odgovoran za pakiranje virusne RNA u čestice. Nasuprot tome, pakirajuće stanice sadrže tri skupine virusnih gena (*gag*, *pol*, *env*), no budući da nemaju slijed  $\psi$ , ne mogu samostalno stvarati retrovirusne čestice, prije unošenja odgovarajućih retrovirusnih ekspresijskih vektora transfekcijom. Koristili smo amfotropni sustav *Phoenix* (**Slika 16**) temeljen na virusu mišje leukemije MoMLV (od engl. *Moloney murine leukemia virus*) pomoću kojeg se željeni gen može ubaciti u proliferirajuće stanice većine sisavaca, uključujući i čovjeka.



**Slika 16:** Sustav Phoenix za proizvodnju retrovirusa i infekcija ciljnih stanica

### **3.2.1. Uspostavljanje i održavanje kulture pakirajućih stanica Phoenix A**

Stanice Phoenix A (izvedene iz HEK 293 (293T)), održavane su u kulturi tako da nikada ne dostignu potpunu konfluenciju, budući da se na taj način smanjuje učinkovitost njihove transfekcije. Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM, te su svaka 2-3 dana, odnosno pri konfluentnosti od 70-80% tripsinizirane i presađene u novu Petrijevu posudicu promjera 100 mm u razrjeđenju 1:4 ili 1:5. Periodično su stanice izložene selekciji higromicinom (Sigma, Njemačka) pri koncentraciji 300 µg/mL u trajanju od jednog tjedna.

### **3.2.2. Transfekcija stanica za pakiranje Phoenix A**

18 do 24 sata prije transfekcije nasadili smo 1,5 do 2 milijuna stanica Phoenix A u Petrijevu posudicu za uzgoj kultura stanica promjera 60 mm u 4 ml tekuće hranjive podloge DMEM. Sljedeći dan, pri konfluentnosti od 70-80%, stanice smo transficirali korištenjem reagensa Lipofectamine 2000 (Life Technologies, SAD). Transfekcijom smo u stanice ubacili retrovirusni ekspresijski vektor Rpuro, izveden iz REBNA, koji sadrži gen za  $\Delta Np73\alpha$ , odnosno prazni Rpuro kao kontrolu. Oba konstrukta dobivana su ljubaznošću dr. sc. U. Moll, SUNY Stony Brook, SAD. Ukratko, 8 µg plazmidne DNA dodali smo u 500 µL tekuće hranjive podloge OptiMEM (Life Technologies, SAD). U drugih 500 µL tekuće hranjive podloge OptiMEM dodali smo 20 µL reagensa za transfekciju Lipofectamine 2000, te inkubirali 5 min pri sobnoj temperaturi. Zatim smo prebacili otopinu s plazmidnom DNA u otopinu s Lipofectaminom 2000, lagano promiješali te inkubirali još 20 min. Transfekcijsku otopinu pažljivo smo dokapali na stanice kojima je prije transfekcije zamijenjena tekuća hranjiva podloga svježom. Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije zamijenili smo tekuću hranjivu podlogu svježom.

### **3.2.3. Retrovirusna infekcija ciljnih stanica**

Četrdeset i osam sati nakon transfekcije prebacili smo tekuću hranjivu podlogu iz Petrijeve posudice s transficiranim stanicama Phoenix A s proizvedenim retrovirusima na ciljne stanice (U2OS, NHF ili NHF-E6) uz prethodno filtriranje kroz filter veličine pora 0,45 µm i dodatak kationskog polimera polibrena (heksadimetrim bromid, Sigma, Njemačka) za povećanje učinkovitosti infekcije.

Dvadeset i četiri sata nakon infekcije ciljnih stanica zamijenili smo tekuću hranjivu podlogu svježim DMEM-om. Ciljne stanice smo tripsinizirali i rasadili u nove Petrijeve posudice te smo ih nakon 24 sata izložili selekciji puromicinom (BD Biosciences, SAD) pri koncentraciji 1 µg/mL u trajanju 4-5 dana. Plazmid Rpuro sadrži i gen za otpornost na antibiotik puromicin, pomoću kojeg smo selektirali ciljne stanice kod kojih je došlo do ugradnje virusne DNA u genom. Učinkovitost retrovirusne infekcije stanica, odnosno postignutu razinu ektopične ekspresije ΔNp73α provjerili smo metodom Western blot i imunofluorescencijom korištenjem specifičnog primarnog protutijela.

### **3.3. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot**

#### **3.3.1. Izdvajanje proteina**

Za analizu proteina koristili smo nekoliko različitih načina izdvajanja proteina, ovisno o proteinima koje smo htjeli ispitati i u skladu sa zahtjevima pojedinih specifičnih protutijela.

Budući da smo uglavnom uzimali usporedno od istih uzoraka dio za analizu proteina, a dio za protočnu citometriju, stanice u kulturi u Petrijevim posudicama promjera 60/100 mm u određenim vremenskim razdobljima odvojili smo od podloge pomoću otopine tripsina uz dodatak EDTA (0,25% tripsin, 1 mM EDTA), isprali dva puta PBS-om uz centrifugiranje 5 min pri 1000 g i 4°C. Zatim smo taloge stanica prebacili u mikroeprovete od 1,5 mL u 1 mL PBS-a, centrifugirali pri 3000 g te taloge prebacili najprije nakratko u tekući dušik, a zatim u zamrzivač pri -80°C do izdvajanja proteina.

Proteine smo najčešće izdvajali pomoću pufera za lizu stanica s detergentom NP-40 (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 0,2% NP-40/Triton X-100, 1 mM EDTA). Neposredno prije izdvajanja proteina u odgovarajući volumen pufera za lizu stanica dodali smo DTT (u konačnoj koncentraciji 1 mM), natrijev vanadat (u konačnoj koncentraciji 0,1 mM) i inhibitore proteaza (complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche, Švicarska). Taloge stanica smo zatim izvadili na led i dodali najprije po 100 µL (ako smo stanice sakupili iz Petrijevih posudica promjera 100 mm) pufera za lizu stanica s DTT, natrijevim vanadatom i inhibitorima te inkubirali na ledu. Nakon 15 min na taloge smo dodali još po 50 µL pripremljenog pufera za lizu, resuspendirali taloge te inkubirali još 15 min. Nakon toga smo centrifugirali uzorke 5 min pri 16 000 g i 4°C, te prebacili supernatante

u nove mikroepruvetice. Uzorci su zatim spremni za određivanje koncentracije proteina te se mogu čuvati dulje vrijeme u zamrzivaču pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Drugi način izolacije proteina uključuje korištenje Laemli pufera i sonikaciju čime se dobiju ukupni stanični proteini (uključujući one vezane za kromatin), a ne samo oni koji su topivi u detergentu NP-40. Na taloge stanica dodali smo 150  $\mu\text{L}$  zagrijanog pufera Laemli (0,1 M Tris pH 6,8, 2% SDS, 40% glicerol) te zagrijali pri  $96^{\circ}\text{C}$  tijekom 5 min. Zatim smo uzorke sonicirali, centrifugirali 5 min pri 16 000 g i  $4^{\circ}\text{C}$ , te supernatante prebacili u nove mikroepruvete.

Za detekciju endogenih izoformi p73 koristili smo dvije modificirane metode izdvajanja proteina koje uključuju pufer za lizu s detergentom NP-40, odnosno sonikaciju, no prilagođene su jer je ove proteine dosta teško detektirati na endogenoj razini zbog njihove često niske razine ekspresije. Pufer za lizu (100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 10% glicerol, 0,1% NP-40, 0,2 mM EDTA) s inhibitorima proteaza dodali smo izravno na stanice u Petrijevoj posudici iz koje je prethodno uklonjena tekuća hranjiva podloga te su isprane hladnim PBS-om. Zatim smo stanice postrugali pomoću strugalice za stanice (engl. *policeman*), sakupili i prebacili u mikroepruvetu i ostavili na suhom ledu. Nakon 15 min staničnu suspenziju propuhali smo nekoliko puta kroz iglu promjera otvora 25 mm. Zatim smo uzorke centrifugirali tijekom 7 min pri 1500 g i  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo prebacili u nove mikroepruvetice i spremili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

U drugom načinu izdvajanja proteina sa stanica smo uklonili tekuću hranjivu podlogu, isprali hladnim PBS-om i dodali 400  $\mu\text{L}$  PBS-a s inhibitorima proteaza. Stanice smo zatim postrugali s podloge pomoću strugalice i prebacili u mikroepruvetu. Zatim smo sonicirali uzorke, i spremili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima koristili smo komplet *BCA Protein Assay Kit* (Pierce, Thermo Scientific, SAD). U bunariće plastične pločice s 96 bunarića najprije smo nanosili po 10  $\mu\text{L}$  otopina albumina iz govedjeg seruma BSA (od engl. *bovine serum albumine*; Pierce, SAD) u različitim koncentracijama (125, 250, 500, 750, 1000 i 1500  $\mu\text{g/mL}$ ), kvarcne vode kao slijepe probe, a zatim razrijeđene uzorke proteina (1  $\mu\text{L}$  uzorka u 9

$\mu\text{L}$  kvarcne vode). Sve smo radili u triplikatu te smo na kraju dodavali po 200  $\mu\text{L}$  reagensa iz kompleta *BCA Protein Assay Kit* nastalog neposrednim miješanjem otopine A i otopine B u omjeru 50:1. Zatim smo pločicu inkubirali u vodenoj kupelji za mikrotitarske pločice tip 1083 (GFL, Njemačka) tijekom 30 min pri 37°C, nakon čega smo izmjerili apsorbanciju pri 570 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice *Multiskan MS* (Labsystems, Finska). Na temelju vrijednosti apsorbancije dobivenih za otopine BSA poznatih koncentracija izradili smo standardnu krivulju iz koje smo onda na temelju izmjerene apsorbancije izračunali koncentracije ukupnih proteina u pojedinim uzorcima.

Uzeli smo po 30  $\mu\text{g}$  ukupnih proteina i dodali određeni volumen 4 puta koncentriranog pufera za nanošenje uzoraka (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) tako da njegova konačna koncentracija bude 1 puta. Zatim smo uzorke zagrijali tijekom 5 min pri 96 °C čime se pospješuje denaturacija proteina djelovanjem anionskog detergenta natrijevog dodecilsulfata (SDS, engl. *sodium dodecylsulphate*). Ovako pripremljene uzorke odmah smo nanijeli na poliakrilamidni gel ili smo ih čuvali u frižideru na -20 °C do korištenja.

### 3.3.3. Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida

Natrijev dodecilsulfat-elektroforeza u poliakrilamidnom gelu ili SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) temelji se na denaturirajućem djelovanju SDS-a koji se nalazi u sastavu gela i pufera za elektroforezu na proteine, čime oni postaju negativno nabijeni, te se u električnom polju razdvajaju isključivo na temelju razlika u njihovoj veličini/molekulskoj masi.

Koristili smo diskontinuiranu elektroforezu koja se sastoji od donjeg gela za razdvajanje uzoraka (**Tablica 2**) i gornjeg gela za sabijanje (**Tablica 3**) koji se razlikuju po sastavu pufera, odnosno pH vrijednosti pri kojoj su puferirani. Koristili smo uređaj za vertikalnu elektroforezu Mini-Protean III (BioRad, SAD), a najčešće smo koristili 10 i 8%-tne gelove. Tijek elektroforeze pratili smo pomoću proteinskog markera Precision Plus Protein Standards Dual Color (BioRad, SAD) te fronte bromfenolnog plavila. Elektroforeza je tekla u puferu za elektroforezu (1 M glicin, 50 mM Tris, 1% SDS) pri konstantnom naponu od 90 V dok uzorci nisu prešli u donji gel za razdvajanje, a zatim konstantno pri 110 V do završetka.

**Tablica 2: Sastav smjese za gel za razdvajanje (donji gel).** Prikazani su volumni udjeli pojedinih sastojaka u ukupnoj smjesi.

Sastojak	Volumni udio u 8%-tnom gelu/%	Volumni udio u 10%-tnom gelu/%	Volumni udio u 12%-tnom gelu/%
Voda	46	40	33
Otopina 30% akrilamida i 7% bisakrilamida	27	33	40
1,5 M Tris (pH 8,8)	25	25	25
10%-tna otopina SDS	1	1	1
10%-tna otopina amonijevog persulfata	1	1	1
TEMED	0,06	0,04	0,04

**Tablica 3: Sastav smjese za gel za sabijanje (gornji gel).** Prikazani su volumni udjeli pojedinih sastojaka u ukupnoj smjesi.

Sastojak	Volumni udio u 5%-tnom gelu/%
Voda	68
Otopina 30% akrilamida i 7% bisakrilamida	16,6
1 M Tris (pH 6,8)	12,6
10%-tna otopina SDS	1
10%-tna otopina amonijevog persulfata	1
TEMED	0,1

### 3.3.4. Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na membranu nitroceluloze

Po završetku elektroforeze, u puferu za prijenos (200 mM Tris, 1,5 M glicin, 20% metanol) sastavili smo aparaturu za prijenos sastavljenu od spužvica, Whatman papira, gela i membrane. Koristili smo nitroceluloznu membranu *Protran BA 85* (Whatman™, GE Healthcare, SAD) veličine pora 0,2 μm. Prijenos je trajao 1 sat pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA u uređaju za prijenos Mini-PROTEAN III (BioRad, SAD).

### 3.3.5. Bojenje naftolnim plavilom i blokiranje membrane

Nakon prijenosa proteina membranu smo isprali u puferu 1×TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween20), te smo je obojili u otopini boje naftolnog plavila (10% metanol, 2% octena kiselina, 0,1% naftolno plavilo). Na taj način provjerili smo učinkovitost prijenosa proteina različitih molekulskih masa na membranu. Za odbojavanje koristili smo otopinu 7%-tne octene kiseline i 40%-tnog metanola u vodi. Obojenu membranu smo skenirali i koristili kao kontrolu nanošenja uzoraka.

Odbojenu membranu isprali smo nekoliko puta u puferu 1×TBST zbog uklanjanja kiselosti, a zatim je blokirali minimalno 20 min u 4%-tnoj otopini bezmasnog mlijeka u 1×TBST pri sobnoj temperaturi.

### 3.3.6. Imunodetekcija proteina na membrani

Membranu smo najprije inkubirali u otopini specifičnog primarnog protutijela tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4°C, isprali 3 puta u 1×TBST. Popis korištenih primarnih protutijela prikazan je u **tablici 4**. Zatim smo je inkubirali u otopini odgovarajućeg sekundarnog protutijela na koji je vezan enzim peroksidaza iz hrena. Ovisno o podrijetlu primarnog protutijela koristili smo sekundarno protumišje *Amersham ECL Anti-mouse IgG, HRP-linked whole antibody* (GE Healthcare, SAD) ili protukuničje *Amersham ECL RAbbit IgG, HRP-linked whole antibody* (GE Healthcare, SAD) protutijelo u razrjeđenju 1:3000. Dodatkom kemiluminiscencijskog supstrata na membranu dolazi do emisije svjetla na mjestima gdje je enzim vezan. Koristili smo sustave za detekciju kemiluminiscencijom *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Pierce, SAD), *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, SAD) ili *Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate* (PerkinElmer, SAD). Detekcija signala provedena je korištenjem uređaja za razvijanje *Alliance 4.7* (UVItec, Velika Britanija) ili izlaganjem filmova *Amersham Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film* (GE Healthcare, SAD) na membrani i njihovim razvijanjem u uređaju za razvijanje rentgenskih filmova *Curix 60* (Agfa, Belgija).

**Tablica 4: Korištena primarna protutijela, životinjsko porijeklo, korišteno razrjeđenje i proizvođač.**

Naziv protutijela	Porijeklo	Korišteno razrjeđenje	Proizvođač
Protu-p73 ER15	Miš	1/100	Calbiochem, SAD
Protu-p73 GC15	Miš	1/50	Calbiochem, SAD
Protu-p73 IMG246	Miš	1/1000	Imgenex, SAD
Protu-ΔNp73-27	Kunić	1/2000	Dobiveno ljubaznošću dr. sc. B. Vojteseka, Masaryk Memorial Cancer Institute, Češka
Protu-p21	Miš	1/200	Santa Cruz, SAD
Protu-p21 SC-397	Kunić	1/200	Santa Cruz, SAD
Protu-p27	Kunić	1/400	Santa Cruz, SAD
Protu-cA	Miš	1/400	Novocastra, UK
Protu-cB1 SC-245	Miš	1/300	Santa Cruz, SAD
Protu-pRb	Miš	1/400	Pharmingen, SAD
Protu-Chk2 Cl 7	Miš	1/500	Millipore, SAD
Protu-P <sup>T68</sup> Chk2	Kunić	1/500	Cell Signaling, SAD
Protu-Chk1	Kunić	1/500	Santa Cruz, SAD
Protu-P <sup>S317</sup> Chk1	Kunić	1/150	Cell Signaling, SAD
Protu-P <sup>S345</sup> Chk1	Kunić	1/150	Santa Cruz, SAD
Protu-p53 DO1	Miš	1/2000	Santa Cruz, SAD
Protu-P <sup>S15</sup> p53	Kunić	1/1000	Cell Signaling

### 3.4. Analiza ekspresije proteina metodom imunofluorescencije

#### 3.4.1. Fiksacija i permeabilizacija stanica

Stanice smo nasadili u Petrijeve posudice promjera 35 ili 60 mm na okrugla pokrovna stakalca promjera 12 mm (Marienfeld, Njemačka), te nakon 24 sata izložili djelovanju određenog spoja koji izaziva oštećenje DNA. Zatim smo ih fiksirali korištenjem 4%-tne otopine formaldehida u PBS-u tijekom 15 min pri sobnoj temperaturi ili u otopini metanola tijekom 10 min pri -20°C, ovisno o zahtjevima određenog proteina/specifičnog protutijela.



### **3.4.2. Imunodetekcija proteina**

Stanice fiksirane u 4%-tnoj otopini paraformaldehida prethodno smo permeabilizirali u 0,2%-tnoj otopini detergenta Triton X-100 ili NP-40 u PBS-u, dok su one fiksirane u metanolu bile spremne za korištenje.

Stanice smo inkubirali u otopini primarnog protutijela u 5%-tnoj otopini FBS-a u PBS-T (0,1% Tween20 u PBS-u) 2 sata pri sobnoj temperaturi u vlažnoj komori. Zatim smo ih isprali 3 puta u PBS-T, te inkubirali tijekom 1 sata pri sobnoj temperaturi u vlažnoj komori u mraku u otopini sekundarnog protutijela na kojeg je vezan određeni fluorofor. Najčešće smo istovremeno analizirali dva različita proteina korištenjem specifičnih protutijela proizvedenih u različitim životinjama, te u skladu s tim i dva odgovarajuća sekundarna protutijela, protumišje obilježeno bojom Texas Red i protukuniće obilježeno bojom Alexa 488 (Molecular Probes, Life Technologies, SAD).

Potom smo stanice ponovno isprali 3 puta u PBS-T. U treće ispiranje dodali smo boju Hoechst 33258 (Sigma, Njemačka) za DNA, inkubirali 5 min u mraku te isprali još jednom u PBS-T. Zatim smo uzorke uklopili na predmetnim stakalcima korištenjem medija za uklapanje Mowiol (Calbiochem, SAD). Uzorci se mogu analizirati na fluorescencijskom mikroskopu već nakon 30-45 min, ili pohraniti u mraku pri 4°C i na dulje vrijeme.

Uzorke smo analizirali na konfokalnom mikroskopu LeicaTSC SP<sub>2</sub> (Leica Microsystems, Njemačka).

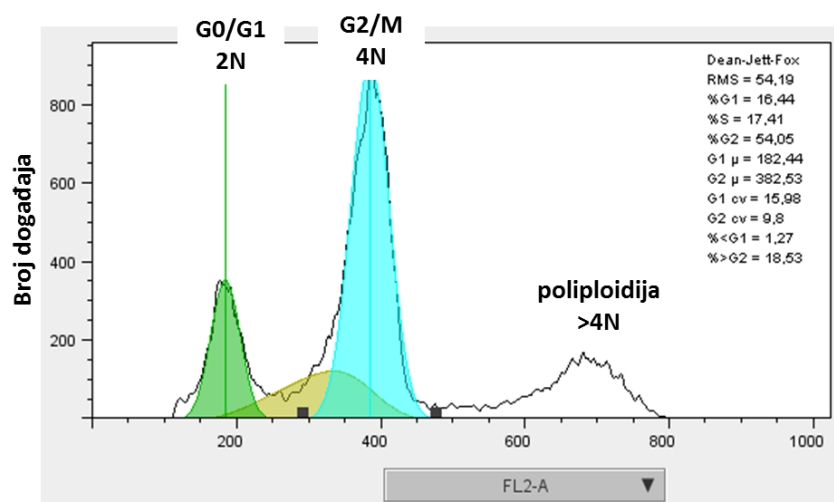
### **3.5. Analiza ulaska stanica u replikaciju ugradnjom bromodeoksiuridina**

Bromodeoksiuridin (BrdU) se ugrađuje u DNA tijekom replikacije umjesto timidina te se može koristiti za praćenje proliferacije stanica kao zamjena za radioaktivni timidin. Kratkim izlaganjem BrdU (15-30 min) mogu se detektirati stanice koje su u određenom trenutku bile u fazi S, dok dulje izlaganje (npr. 24 sata) omogućava kvantifikaciju svih stanica koje su u tom razdoblju prošle kroz fazu S. Prisutnost BrdU može se detektirati pomoću specifičnog primarnog protutijela, npr. metodom imunofluorescencije.

Stanice smo nasadili na okrugla pokrovna stakalca za imunofluorescenciju. Uz odgovarajuće tretmane agensima koji oštećuju DNA, stanice smo u određenom trenutku izložili djelovanju BrdU (Sigma, Njemačka) u koncentraciji 10  $\mu$ M. Nakon određenog vremena fiksirali smo ih korištenjem 4%-tne otopine formaldehida, te nastavili s klasičnim postupkom imunofluorescencije. Jedini dodatni korak bio je izlaganje djelovanju 2N HCl tijekom 15 min nakon permeabilizacije stanica u 0,2%-tnoj otopini detergenta Triton X-100 (Sigma, Njemačka) ili NP-40 u PBS-u čime smo denaturirali staničnu DNA. Koristili smo primarno protutijelo za BrdU (GE Healthcare, SAD). Uzorke smo analizirali na fluorescencijskom mikroskopu te rezultate kvantificirali brojanjem BrdU-pozitivnih stanica u pojedinim uzorcima.

### 3.6. Analiza staničnog ciklusa metodom protočne citometrije

Raspodjelu stanica po fazama staničnog ciklusa analizirali smo protočnom citometrijom na temelju mjerenja intenziteta fluorescencije koja potječe od propidij jodida, boje koja se interkalira u DNA. Intenzitet fluorescencije odnosno količina vezanog propidij jodida proporcionalna je količini DNA u stanici. Poznato je da u fazi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> stanica sadrži jednostruku količinu DNA (2N kod diploidnih organizama), u fazi G<sub>2</sub>/M dvostruku (4N), dok je tijekom faze S sadržaj DNA između te dvije vrijednosti. U slučaju da stanica ima sadržaj DNA veći od 4N govorimo o poliploidiji (**Slika 17**).



**Slika 17: Histogram raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa.** Na osi X prikazan je intenzitet crvene fluorescencije, proporcionalan količini DNA (kanal FL2-A), a na osi Y broj događaja, odnosno analiziranih stanica.

Stanice smo nasadili u Petrijeve posudice (Sarstedt, Njemačka) promjera 60 ili 100 mm, izložili djelovanju određenog agensa koji izaziva oštećenje DNA te nakon određenog vremena odvojili od podloge djelovanjem tripsina. Zatim smo resuspendirali odvojene stanice u odgovarajućem volumenu tekuće hranjive podloge DMEM i centrifugirali tijekom 5 min pri 1000 g i 4°C. Talog stanica smo zatim isprali 2 puta u odgovarajućem volumenu hladnog PBS-a, te na kraju resuspendirali u 1 mL PBS-a. Zatim smo suspenziji stanica dodali 3 mL etanola uz sporo miješanje na vibracijskoj mješalici Vortex Mixer VM-300 (NeoLab® Labor Spezialprodukte, Njemačka) čime se stanice fiksiraju, a njihova membrana postaje propusna. Tako fiksirane stanice mogu se čuvati određeno vrijeme pri 4°C ili -20°C do analize.

Prije analize na protočnom citometru, uzorke smo centrifugirali tijekom 5 min pri 1000 g i 4°C. Zatim smo ih isprali dva puta u 5 mL hladnog PBS, centrifugirali tijekom 5 min pri 1000 g i 4°C, i na kraju resuspendirali u 200 µL otopine RNaze A (Qiagen, SAD) koncentracije 0,1 µg/µL. Uzorke smo zatim inkubirali u vodenoj kupelji pri 37°C tijekom 15 min te ih prebacili na led i dodali po 200 µL otopine propidij jodida (Sigma, Njemačka) koncentracije 50 µg/mL (tako da konačna koncentracija propidij jodida bude 25 µg/mL). Prije analize uzorke treba ostaviti najmanje 30 min u tami kako bi došlo do interkalacije propidij jodida u DNA.

Analizu uzoraka proveli smo na protočnom citometru FACSCalibur (Becton-Dickinson, SAD) uz podršku programa CellQuest (Becton-Dickinson, SAD). Analizirali smo obično po 20 000 stanica (broj događaja) po uzorku. Dobivene histograme analizirali smo pomoću komercijalnog programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, SAD), te smo dobili udjele stanica po pojedinim fazama staničnog ciklusa.

### **3.7. Videomikroskopija s protokom vremena**

Videomikroskopija s protokom vremena (eng. *time-lapse*) omogućava dobivanje vrijednih informacija o sudbini pojedinih stanica (učestalost, trajanje i ishod mitoze, stanična smrt). Pokuse videomikroskopije izveli smo na inverznom mikroskopu širokog polja (Leica DMIRE2, Njemačka) opremljenom kamerom Micromax YHS 1300 te komorom s kontroliranim uvjetima koncentracije CO<sub>2</sub>, temperature i vlažnosti. Stanice smo snimali u

razdobljima od 10 min i to po tri različita položaja za svaki uzorak tijekom 48 sati, a dobivene filmove smo potom analizirali.

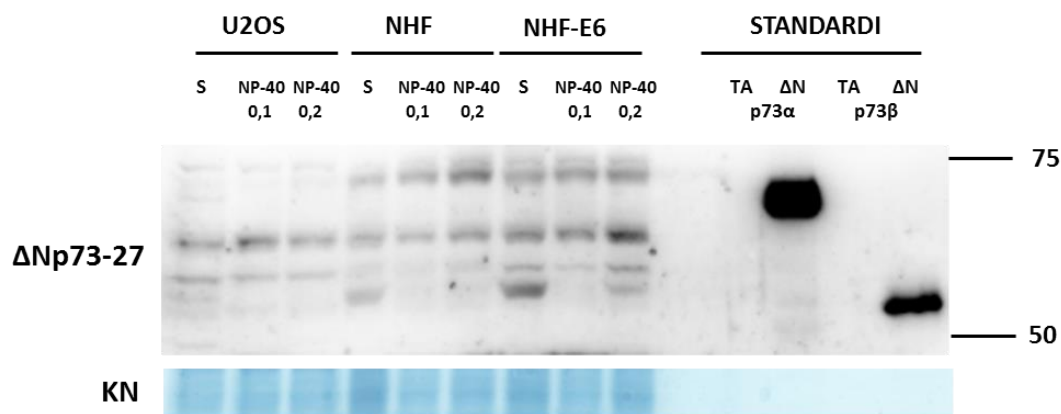
## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza ekspresije $\Delta Np73\alpha$ u normalnim i tumorskim staničnim linijama

#### 4.1.1. Analiza endogene ekspresije izoforme $\Delta Np73\alpha$

Za istraživanje uloge izoforme  $\Delta Np73\alpha$  u staničnom odgovoru na oštećenje DNA odabrali smo dva različita stanična modela. Prvi model predstavljaju fibroblasti čovjeka NHF (Baus i sur., 2003) koji su najbolji *in vitro* model za proučavanje staničnog ciklusa jer su u tim stanicama signalni putevi minimalno promijenjeni. Dio istraživanja proveli smo na fibroblastima NHF-E6 (Baus i sur., 2003) koji su stabilno transficirani onkoproteinom E6 humanog papiloma virusa HPV-16, koji potiče degradaciju p53 (Scheffner i sur., 1993). Stanice NHF-E6 u usporedbi s NHF predstavljaju dobar model za proučavanje ovisnosti regulacije staničnog ciklusa i odgovora na oštećenje DNA o ekspresiji p53 (Baus i sur., 2003). Budući da je većina dosadašnjih istraživanja vezanih uz izoformu  $\Delta Np73\alpha$  provedena na tumorskim staničnim linijama čovjeka, rezultati dobiveni na normalnim stanicama mogli bi dati vrijedne podatke o eventualnoj sposobnosti ovog proteina da djeluje na netaknute mehanizme regulacije staničnog ciklusa. Kao drugi model, koristili smo staničnu liniju osteosarkoma čovjeka U2OS koja je često korištena u proučavanju staničnog ciklusa u uvjetima genotoksičnog stresa, te je u njoj prisutna ekspresija proteina p53 i proteina iz obitelji pRb divljeg tipa. No, u stanicama U2OS, unatoč prisutnosti p53, nakon oštećenja DNA dolazi do spore indukcije p21 zbog poremećaja u aktivaciji signalnog puta ATM/p53/p21 (Lossaint i sur., 2011) te stoga izostaje zastoje u fazi G1 (Kleiblova i sur., 2013).

Najprije smo u odabranim staničnim linijama ispitali prisutnost i razinu endogene ekspresije proteina  $\Delta Np73\alpha$ . Zbog poteškoća u detekciji i razlikovanju pojedinih izoformi kao posljedica njihove često niske razine ekspresije odnosno nespecifičnosti primarnih protutijela, te s obzirom da različita primarna protutijela preferiraju određene uvjete uspoređena su tri različita načina izdvajanja proteina iz stanica (**Slika 18**).



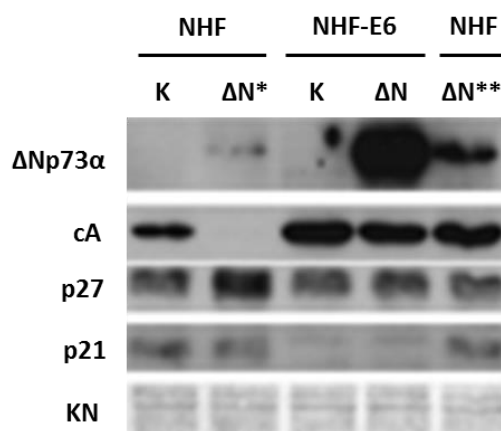
**Slika 18: Endogena ekspresija izoformi proteina p73 u normalnim i tumorskim staničnim linijama:** Proteini iz stanica U2OS, NHF i NHF-E6 izdvojeni su na tri različita načina: sonikacijom - S, te pomoću pufera za lizu stanica s dvije različite koncentracije detergenta NP-40 (0,1, odnosno 0,2%). Korišteno je nekomercijalno primarno kuničje poliklonalno protutijelo specifično za izoforme  $\Delta$ Np73 ( **$\Delta$ Np73-27**). Kao standardi za identifikaciju pojedinih izoformi p73 korišteni su proteinski ekstrakti stanica H1299 transficiranih plazmidnim ekspresijskim vektorima za izoforme TAp73 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , TAp73 $\beta$  i  $\Delta$ Np73 $\beta$ . **KN** - kontrola nanošenja.

Kao standarde za identifikaciju (razlikovanje) pojedinih izoformi koristili smo proteinske ekstrakte stanica H1299 transficiranih različitim plazmidnim ekspresijskim vektorima koji nose gen za odgovarajuću izoformu proteina p73. Korištenjem nekomercijalnog primarnog protutijela specifičnog za izoforme  $\Delta$ Np73 ( $\Delta$ Np73-27, dobivenog ljubaznošću dr. sc. B. Vojteseka), nismo utvrdili prisutnost izoformi  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ni  $\beta$  u stanicama U2OS, NHF ni NHF-E6. Stoga smo zaključili kako ove stanične linije predstavljaju pogodan model za proučavanje učinka ektopične ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na kontrolu staničnog ciklusa u uvjetima genotoksičnog stresa.

#### 4.1.2. Ektopična ekspresija $\Delta$ Np73 $\alpha$ u stanicama NHF

Nakon retrovirusne infekcije stanica NHF i NHF-E6 te selekcije puromicinom provjerili smo razinu ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  metodom Western blota (**Slika 19**). Uočili smo razlike u razini ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  između NHF i NHF-E6, čak i između različitih uzoraka iste populacije stanica NHF- $\Delta$ N ovisno o gustoći stanica. Istovremeno smo analizirali ekspresiju različitih regulatora staničnog ciklusa u usporedbi s  $\Delta$ Np73 $\alpha$ . Pri većoj gustoći stanica NHF- $\Delta$ N (označeno s \* na **slici 19**) kada do izražaja dolazi kontaktna inhibicija (negativno utječe na proliferaciju), primijećena je niža razina  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u odnosu na stanice manje gustoće (označeno s \*\* na **slici 19**). Istodobno, nije detektirana ekspresija ciklina A, dok je ekspresija

p27 bila povišena, što potvrđuje izlazak stanica iz ciklusa u stanje mirovanja. Kod stanica NHF-E6 postignuta je znatno viša razina ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  nakon retrovirusne infekcije u odnosu na NHF divljeg tipa.



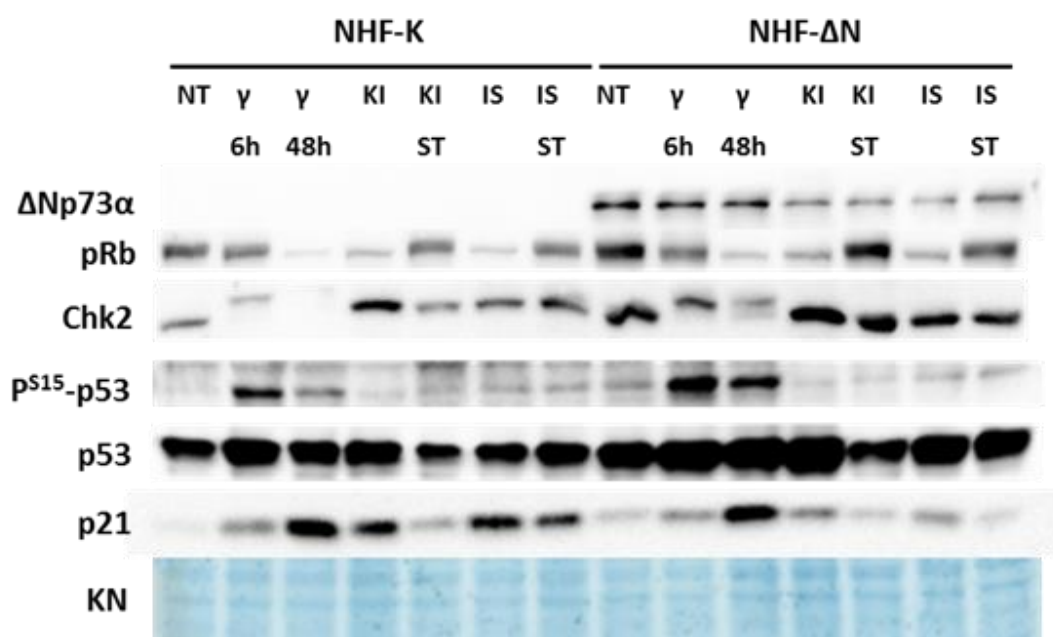
**Slika 19: Analiza ektopične ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i regulatora staničnog ciklusa u stanicama NHF i NHF-E6 nakon retrovirusne infekcije.** Sakupljene su stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (NHF- $\Delta$ N) i kontrolne stanice (NHF-K), te NHF-E6 s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (NHF- $\Delta$ N) i kontrolne stanice (NHF-K). Provjerena je proteinska ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , te analizirana ekspresija ciklina A (cA), p27 i p21. Uspoređeni su uzorci stanica NHF različite gustoće rasta:  $\Delta$ N\* - stanice veće gustoće rasta;  $\Delta$ N\*\* - stanice manje gustoće rasta; KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

#### 4.1.2.1. Ovisnost ektopične ekspresije $\Delta$ Np73 $\alpha$ o različitim uvjetima rasta stanica NHF

Na temelju prethodnog eksperimenta, koji je ukazao na moguću ovisnost ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  o stupnju stanične proliferacije (**Slika 19**), kao i podataka dostupnih u literaturi (Lefkimmiatis i sur., 2009), odlučili smo detaljnije pratiti razinu  $\Delta$ Np73 $\alpha$  nakon različitih tretmana i uvjeta rasta stanica NHF, te vidjeti utječe li ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na ponašanje stanica u promatranim uvjetima. Naime, u stanicama MCF7 uočeno je da se endogena razina  $\Delta$ Np73 $\alpha$  mijenja pri normalnim uvjetima tijekom staničnog ciklusa, te da je, uz određene druge izoforme obitelji p53, potrebna za ekspresiju niza gena nužnih za odvijanje staničnog ciklusa. U tom radu ispitana je razina ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u uvjetima izgladnjivanja stanica te njihovog povratka u ciklus dodatkom FBS-a (Lefkimmiatis i sur., 2009). Željeli smo detaljnije ispitati mijenja li se i ektopična ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u našem staničnom modelu (stanicama NHF) pri različitim uvjetima rasta stanica (izlasku u stanje mirovanja, ponovnom ulasku u ciklus, te nakon genotoksičnog stresa kojem planiramo izložiti stanice u daljnjem

istraživanju).

Da bi ispitali utječe li izlazak stanica iz ciklusa u G<sub>0</sub>, te ponovni ulazak stanica u ciklus na razinu  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , najprije smo potaknuli stanice na izlazak iz ciklusa u stanje mirovanja na dva različita načina: uzgajanjem stanica bez dodatka FBS-a (izgladnjivanje tijekom 48 sati) i u uvjetima potpune konfluentnosti (djelovanje kontaktne inhibicije tijekom 48 sati). Stanice smo zatim stimulirali za ulazak u stanični ciklus dodatkom FBS-a, odnosno razrjeđivanjem konfluentne kulture (1/8 od ukupnog broja stanica prisutnih nakon rasta u uvjetima potpune konfluentnosti). Western blot analizom najvišu razinu ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  utvrdili smo kod netretiranih proliferirajućih stanica NHF (**Slika 20**). Do značajnijeg smanjenja razine  $\Delta$ Np73 $\alpha$  došlo je kod stanica koje su uzgajane pri uvjetima potpune konfluentnosti te bez dodatka FBS-a. Pritom možemo primijetiti kako je kod stanica koje su nakon izgladnjivanja stimulirane dodatkom 10% FBS-a tijekom 28 sati razina  $\Delta$ Np73 $\alpha$  bila slična onoj prisutnoj u netretiranim stanicama, dok je kod razrijeđenih stanica koje su bile u kontaktnoj inhibiciji i nakon 30 sati ostala niska (**Slika 20**).

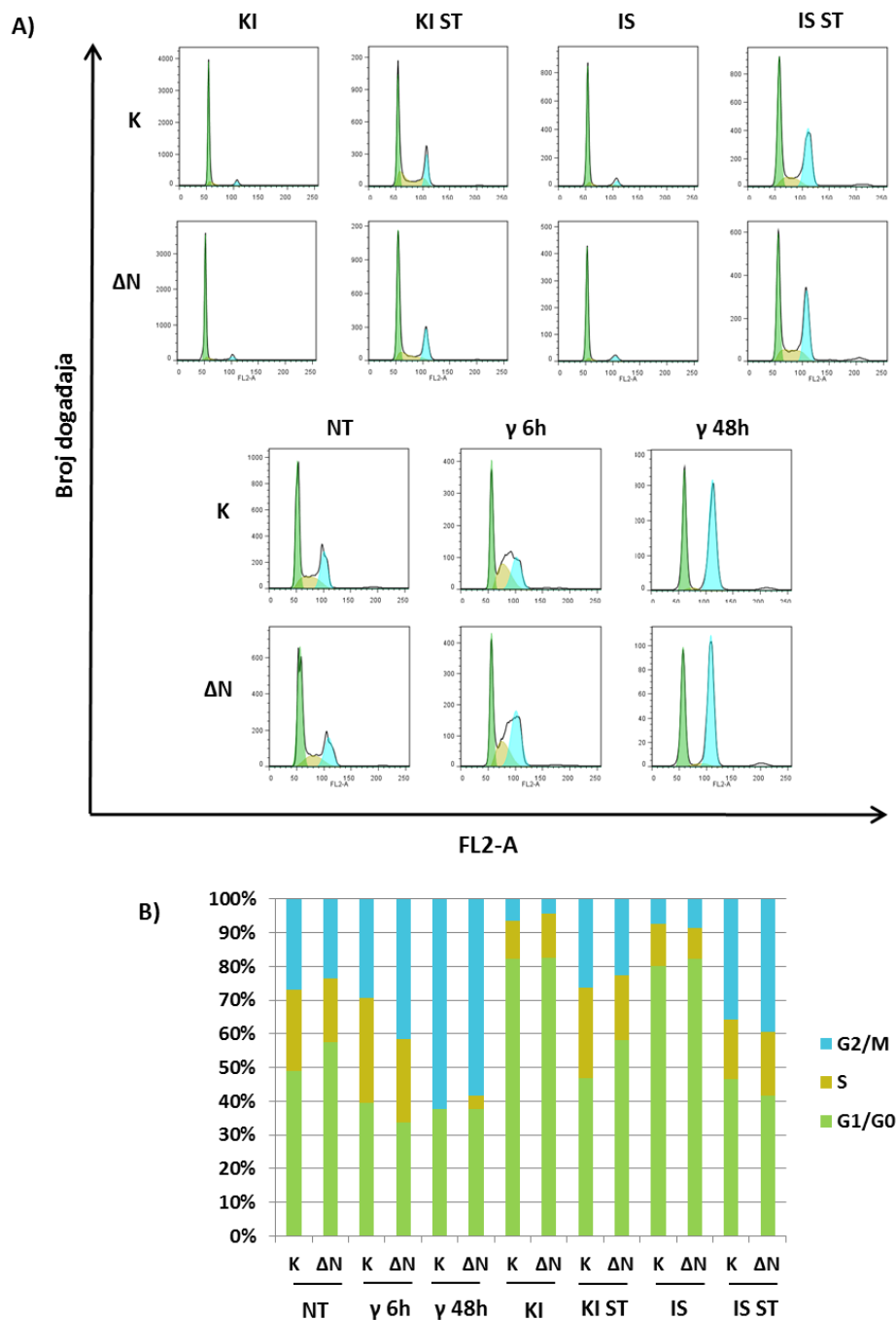


**Slika 20: Ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i regulatora staničnog ciklusa u stanicama NHF nakon rasta u različitim uvjetima.** Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N) i kontrolne stanice (K) uzgajane su u različitim uvjetima te je analizirana ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , p53, p21, i fosforiliranog p53 (p<sup>S15</sup>-p53). **NT** - netretirane proliferirajuće stanice;  **$\gamma$  6 h** - stanice sakupljene 6 sati nakon zračenja dozom od 12 Gy;  **$\gamma$  48 h** - stanice sakupljene 48 sati nakon  $\gamma$ -zračenja dozom od 12 Gy; **KI** - stanice u kontaktnoj inhibiciji; **KI ST** - stanice koje su bile u kontaktnoj inhibiciji te su sakupljene 30 sati nakon razrjeđivanja (stimulacije); **IS** - stanice uzgajane bez FBS-a; **IS ST** - stanice uzgajane bez seruma te sakupljene 28 sati nakon dodatka FBS-a (stimulacije); **KN** - kontrola nanošenja.



Usporedno smo protočnom citometrijom analizirali raspodjelu stanica po različitim fazama staničnog ciklusa nakon bojenja propidij jodidom (**Slika 21A i B**). Zanimljivo, uočili smo kako stanice NHF- $\Delta$ N nešto brže izlaze iz stanja mirovanja nakon dodatka FBS-a u odnosu na NHF-K (40,85% stanica u G0/G1 kod NHF- $\Delta$ N, u odnosu na 45,85% u G0/G1 kod NHF-K). Kod stanica koje su rasle u uvjetima izrazite kontaktne inhibicije 30 sati nakon razrjeđivanja situacija je bila obrnuta, stanice NHF-K su se brže vratile u ciklus u odnosu na NHF- $\Delta$ N. U ovom eksperimentu su stanice oba tipa (NHF-K i NHF- $\Delta$ N) u većoj mjeri izašle iz faze mirovanja nakon stimulacije FBS-om u odnosu na stanice koje su rasle u kontaktnoj inhibiciji pa stimulirane razrjeđivanjem. U stanicama koje su uzgajane bez FBS-a i u uvjetima potpune konfluentnosti detektirali smo samo hipofosforilirani oblik pRb, što upućuje na supresiju gena koji su potrebni za odvijanje ciklusa. Kod uzoraka stanica koje su stimulirane na ulazak u ciklus bilo dodatkom seruma, bilo razrjeđivanjem prevladava hiperfosforilirani pRb kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i kontrolnih stanica, što potvrđuje njihov izlazak iz stanja mirovanja.

U istom eksperimentu željeli smo ispitati utjecaj oštećenja DNA na razinu  $\Delta$ Np73 $\alpha$  te mogući utjecaj  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na odgovor ovih stanica na oštećenje DNA. Stoga smo stanice ozračili dozom od 12 Gy te nakon 6 i 48 sati analizirali ekspresiju  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , pRb, Chk2, p53 i p21, te fosforiliranog p53 (na položaju S15 - P<sup>S15</sup>-p53) (**Slika 20**). Nismo uočili značajan utjecaj  $\gamma$ -zračenja na ekspresiju  $\Delta$ Np73 $\alpha$ . Za detekciju Chk2 koristili smo primarno protutijelo koje prepoznaje ukupni protein bez obzira na fosforilaciju. Budući da fosforilirani oblik proteina putuje sporije od nefosforiliranog oblika, na poliakrilamidnom gelu možemo vidjeti pomak na gore proteinskih vrpca (engl. *SDS-PAGE-shift*) na temelju čega možemo donijeti zaključke o aktivaciji proteina. Kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  uočili smo višu razinu fosforiliranog Chk2 u odnosu na kontrolne stanice. Također, ekspresija proteina p53 bila je viša kod NHF- $\Delta$ N u odnosu na NHF-K nakon  $\gamma$ -zračenja, kao i razina P<sup>S15</sup>-p53. Suprotno, istovremeno je indukcija proteina p21 bila slabija kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  (**Slika 20**). Razlika između NHF-K i NHF- $\Delta$ N uočena je i u raspodjeli stanica po fazama staničnog ciklusa nakon zračenja, pri čemu su veći postotak stanica sa sadržajem DNA 4N imale NHF- $\Delta$ N 6 i 48 sati nakon zračenja u odnosu na NHF-K (**Slika 21A i B**).



**Slika 21: Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na izlazak stanica NHF iz stanja mirovanja (G0) i odgovor na oštećenje DNA izazvano  $\gamma$ -zračenjem.** Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) uzgajane su u različitim uvjetima rasta i nakon  $\gamma$ -zračenja, te je analizirana raspodjela stanica po fazama staničnog ciklusa nakon bojenja propidij jodidom. **NT** - netretirane proliferirajuće stanice;  **$\gamma$  6 h** - stanice sakupljene 6 sati nakon zračenja dozom od 12 Gy;  **$\gamma$  48 h** - stanice sakupljene 48 sati nakon zračenja dozom od 12 Gy; **KI** - stanice u kontaktnoj inhibiciji; **KI ST** - stanice koje su bile u kontaktnoj inhibiciji te su sakupljene 30 sati nakon razrijeđivanja (stimulacije); **IS** - stanice uzgajane bez seruma; **IS ST** - stanice uzgajane bez seruma sakupljene 28 sati nakon dodatka seruma (stimulacije). **A)** Histogrami raspodjele stanica po fazama ciklusa. Os X prikazuje intenzitet crvene fluorescencije, odnosno količinu DNA (kanal FL2-A), a os Y broj događaja, odnosno analiziranih stanica. **B)** Raspodjela stanica NHF-K i NHF- $\Delta N$  po različitim fazama staničnog ciklusa nakon rasta u različitim uvjetima i nakon  $\gamma$ -zračenja.

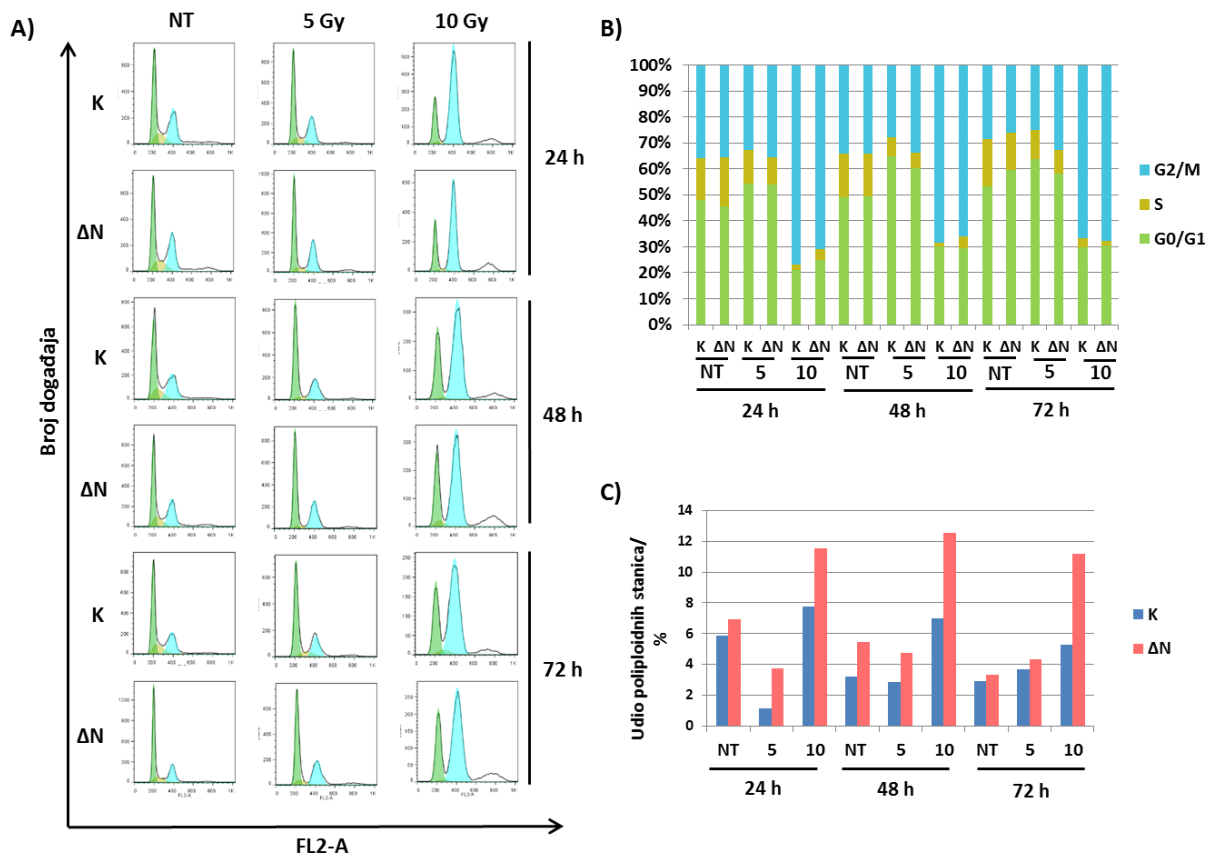
## 4.2. Uloga ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ u odgovoru stanica NHF i NHF-E6 na oštećenje DNA

### 4.2.1. Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa u stanicama NHF nakon $\gamma$ -zračenja

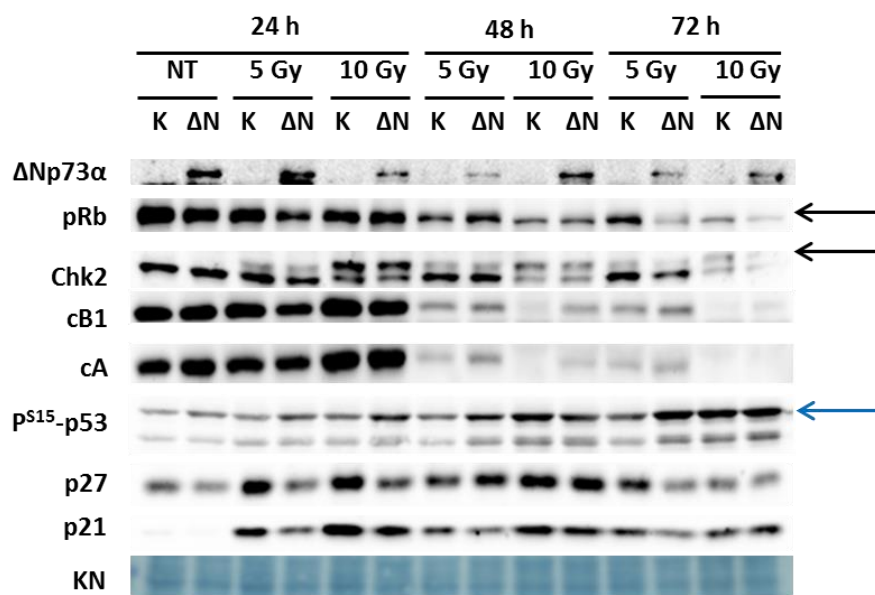
Izlaganje proliferirajućih stanica NHF ionizirajućem zračenju uzrokuje zastoj u kontrolnim točkama G1/S i G2/M, budući da su u njima funkcionalni svi potrebni signalni putevi, uključujući i onaj u kojem sudjeluju p53 i p21, tradicionalno smatran presudnim za regulaciju prijelaza G1/S (Dulić i sur., 1994), a u novije vrijeme i G2/M u ovim stanicama (Baus i sur., 2003; Charrier-Savournin i sur., 2004; Lossaint i sur., 2011). Preliminarni pokusi pokazali su da prisutnost  $\Delta Np73\alpha$  negativno utječe na stanični odgovor na oštećenje DNA zbog niže razine p21 (**Slika 20**). Budući da p53 ima središnju ulogu u kontroli staničnog ciklusa u ovim stanicama, željeli smo detaljnije proučiti posljedice ekspresije  $\Delta Np73\alpha$ , njegovog dominantno-negativnog inhibitora, na regulaciju kontrolnih točki nakon oštećenja DNA.

Stanice smo ozračili dozama od 5 i 10 Gy te nakon 24, 48 i 72 sati protočnom citometrijom analizirali raspodjelu stanica po fazama ciklusa (**Slika 22**). Iz histograma je vidljivo kako je kod niže doze zračenja došlo do naglašenog zastoja u G1 (na temelju odsutnosti stanica u fazi S) te rjeđe do zastoja u G2. Zanimljivo, viša doza zračenja dovela je do povećanja udjela stanica zaustavljenih u G2, puno naglašenije od zastoja u G1. To se može potvrditi i višom razinom ciklina A i B1 kod uzoraka sakupljenih 24 sata nakon zračenja dozom od 10 Gy u odnosu na dozu od 5 Gy, no nismo uočili značajnije razlike između NHF-K i NHF- $\Delta N$  (**Slika 23**). Fosforiliranost Chk2 također je najviša 24 sata nakon zračenja dozom od 10 Gy, no s vremenom razina ekspresije Chk2 opada, kao što je slučaj i s ostalim regulatorima ciklusa (ciklin A i B1). Niža doza zračenja uzrokovala je puno slabiju aktivaciju Chk2. Za razliku od raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa, koja nije pokazala znatnu razliku između netretiranih stanica i onih zračenih dozom od 5 Gy (osim smanjenja udjela stanica u fazi S vidljivog 48 i 72 sati nakon zračenja), smanjena fosforilacija pRb 24 sata nakon zračenja ukazala je na izlazak iz staničnog ciklusa. Očekivano, aktivacija pRb je brža i jača kod stanica ozračenih većom dozom (10 Gy), no razlika između NHF-K i NHF- $\Delta N$  nije

uočena. Udio stanica sa 4N sadržajem DNA u svim promatranim vremenskim razdobljima nakon zračenja dozom od 10 Gy nešto je manji kod NHF- $\Delta$ N, praćeno većim udjelom poliploidnih stanica u odnosu na NHF-K (**Slika 22C**). Nasuprot tome, 48 sata nakon zračenja primijetili smo smanjenje razine pRb, osobito kod više doze, što uz nestanak ciklina A i B1 upućuje na izlazak stanica iz ciklusa u senescenciju. Zanimljivo je da su stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ipak imale nešto višu razinu oba ciklina u usporedbi s kontrolnim stanicama. Razlika je osobito bila naglašena nakon zračenja višom dozom, budući da u kontrolnim stanicama nismo uopće detektirali ekspresiju ciklina A i B1, dok je u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ipak bila prisutna određena razina ekspresije (**Slika 23**).



**Slika 22: Utjecaj  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na raspodjelu stanica NHF po fazama staničnog ciklusa nakon  $\gamma$ -zračenja.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N) i kontrolne stanice (K) ozračene su dozama 5 i 10 Gy, sakupljene nakon 24, 48 i 72 sata, te je protočnom citometrijom analizirana raspodjela stanica po fazama ciklusa nakon bojenja DNA propidij jodidom. **A)** Histogrami raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa. Na osi X prikazan je intenzitet crvene fluorescencije, proporcionalan količini DNA (kanal FL2-A), a na osi Y broj događaja (analiziranih stanica). **B)** Raspodjela stanica NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i kontrolnih po fazama staničnog ciklusa nakon  $\gamma$ -zračenja. **C)** Udio poliploidije stanica NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  te kontrolnih stanica nakon  $\gamma$ -zračenja.



**Slika 23: Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na ekspresiju glavnih regulatora staničnog ciklusa i odgovora na oštećenje DNA u stanicama NHF nakon tretmana  $\gamma$ -zračenjem.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N) i kontrolne stanice (K) ozračili smo s 5 i 10 Gy, sakupili nakon 24, 48 i 72 sata, provjerili ekspresiju  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , te analizirali proteine pRb, Chk2, cB1, cA, p27 i p21, te fosforiliranost p53 na položaju S15. Crne strelice označavaju gornji fosforilirani oblik proteina pRb i Chk2, a plava proteinsku vrpcu koja prema molekularnoj masi odgovara proteinu p53 divljeg tipa, ispod koje je izoforma manje molekulske mase. KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

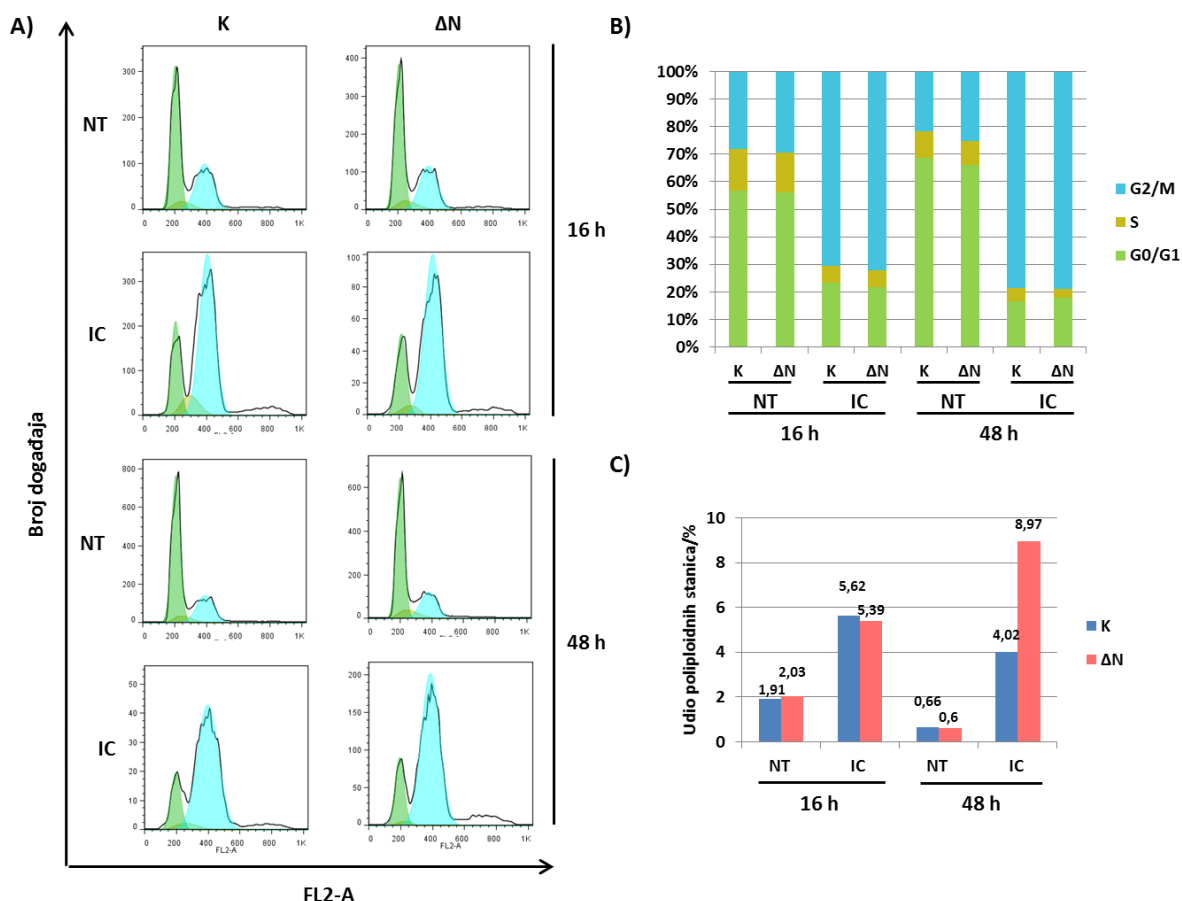
Kao i u prethodnom pokusu (**Slika 20**), fosforilacija p53 na položaju S15 je bila jača kod NHF- $\Delta$ N u odnosu na NHF-K 24 sata nakon tretmana s obje doze, dok su istodobno razine p21 i p27 u NHF- $\Delta$ N bile znatno niže. Te su razlike znatno manje izražene u uzorcima sakupljenima 48 i 72 sata nakon zračenja nižom dozom, dok one gotovo nestaju pri većoj dozi zračenja.

Možemo zaključiti da ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u određenoj mjeri može narušiti kontrolu staničnog ciklusa u normalnim stanicama nakon genotoksičnog stresa, dovodeći do određene genomske nestabilnosti, u vidu povećanog udjela tetraploidije. Taj učinak najvjerojatnije je rezultat smanjenja razine CKI p21 i p27.

#### 4.2.2. Utjecaj ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ na zastoj ciklusa izazvan bleomicinom i ICRF-om u stanicama NHF

Prethodni eksperiment ukazao je da  $\Delta Np73\alpha$  može poremetiti kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA, te dovesti do poliploidije, osobito nakon više doze zračenja koja je izazvala naglašen zastoj u G2 (**Slika 22**). Za specifično proučavanje kontrolne točke u G2/M koristili smo ICRF-193, inhibitor topoizomeraze II koji izaziva isključivo zastoj u G2/M (Downes i sur., 1994; Baus i sur., 2003).

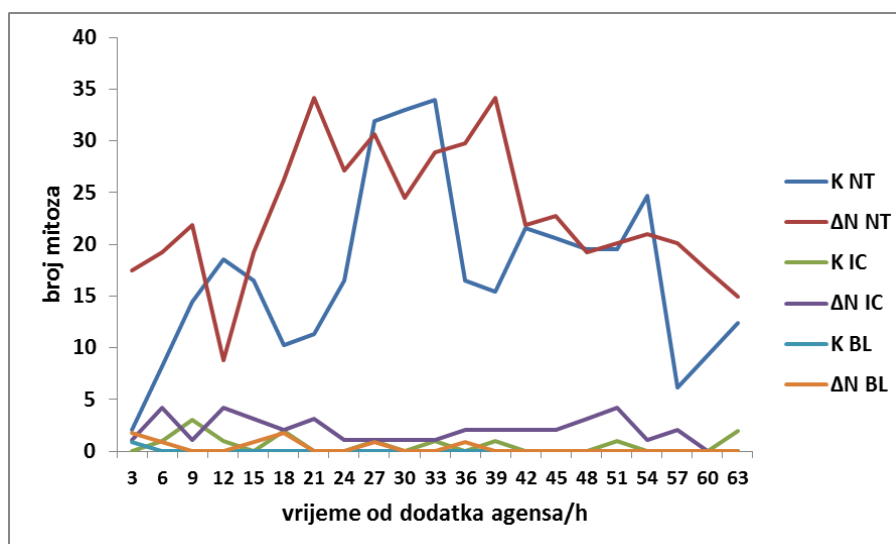
Željeli smo ispitati utječe li ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  na raspodjelu stanica NHF po fazama ciklusa nakon izlaganja ICRF-u. Stanice smo tretirali 16 i 48 sati te analizirali protočnom citometrijom. Očekivano, nakon 16 sati izloženosti ICRF-u kod stanica je bio naglašen zastoj u kontrolnoj točki G2/M (povećan udio stanica sa sadržajem DNA 4N). Ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  kod stanica NHF nije izazvala velike promjene u kontroli staničnog ciklusa u odnosu na kontrolne stanice (**Slika 24A i B**). No, ipak, uočili smo određeni porast udjela poliploidije kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne (**Slika 24C**).



**Slika 24: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na raspodjelu stanica NHF po fazama staničnog ciklusa nakon izlaganja ICRF-u.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) izložene su djelovanju ICRF-a u koncentraciji 2  $\mu\text{g/mL}$  (IC), sakupljene zajedno s netretiranim stanicama (NT) nakon 16 i 48 sati, te je protočnom citometrijom analizirana raspodjela stanica po fazama ciklusa nakon bojenja DNA propidij jodidom. **A)** Histogrami raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa. Na osi X prikazan je intenzitet crvene fluorescencije, proporcionalan količini DNA (kanal FL2-A), a na osi Y broj događaja, odnosno analiziranih stanica. **B)** Raspodjela stanica NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica po fazama staničnog ciklusa nakon izlaganja ICRF-u. **C)** Udio poliploidije stanica NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  te kontrolnih stanica nakon izlaganja ICRF-u. Brojevi iznad stupaca histograma prikazuju postotak poliploidnih stanica u populaciji.

Zanimalo nas je preciznije što se događa sa stanicama tijekom djelovanja agensa koji oštećuju DNA zbog čega smo se odlučili na metodu videomikroskopije s protokom vremena (engl. *time-lapse videomicroscopy*). Videomikroskopija daje vrijedne podatke o sudbini pojedinačnih stanica, duljini zastoja, ulasku u mitozu ili npr. u staničnu smrt. Ovaj eksperiment smo proveli na Institutu za molekularnu genetiku u Montpellieru gdje ne postoji mogućnost primjene ionizirajućeg zračenja zbog čega smo umjesto zračenja, stanice izložili djelovanju radiomimetika bleomicina te ICRF-u. Bleomicin u pravilu izaziva jače oštećenje DNA i zastoj staničnog ciklusa u G1/S i G2/M, za razliku od ICRF-a koji stanice

zaustavlja specifično u G2/M (Downes i sur., 1994; Baus i sur., 2003). Za svaki uzorak odabrana su tri različita vidna polja te su snimana u prosjeku svakih 20 min od čega je napravljen film. Filmski slijed podijeljen je na vremenske intervale u trajanju od 3 sata, određen je broj ulazaka u mitozu u pojedinim intervalima za svaki uzorak te normaliziran prema početnom broju stanica (**Slika 25**).



**Slika 25: Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na zastoj ciklusa izazvan bleomicinom i ICRF-om u stanicama NHF.** Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na učestalost mitozu kod stanica NHF izloženih djelovanju bleomicina i ICRF-a. Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) izložene su djelovanju bleomicina (BL) u koncentraciji 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , odnosno ICRF-a (IC) u koncentraciji 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  tijekom 64 sata tretmana i snimane u vremenskim intervalima od 20 min (engl. *time-lapse videomicroscopy*). Zatim su filmski slijedovi analizirani tako da je izbrojan broj ulazaka u mitozu u intervalima od 3 sata i normaliziran prema početnom broju stanica.

Unatoč određenim razlikama između stanica NHF- $\Delta N$  i kontrolnih stanica tijekom pojedinih promatranih razdoblja, općenito ne možemo sa sigurnošću zaključiti da ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do povećanja broja mitozu kod netretiranih stanica.

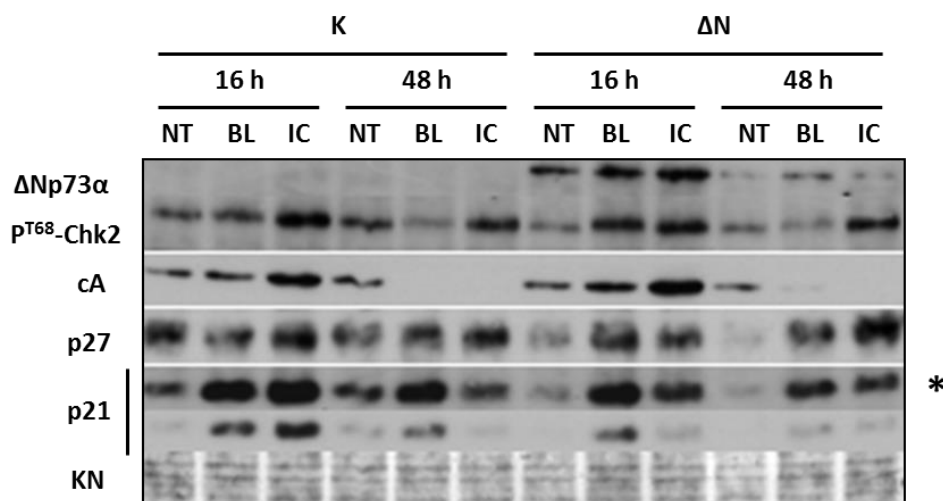
Međutim,  $\Delta Np73\alpha$  omogućava ulazak većeg broja stanica u mitozu u odnosu na NHF-K tijekom izlaganja ICRF-u, što je osobito izraženo nakon duljeg tretmana (nakon 30 sata). Tretman bleomicinom izazvao je jači zastoj stanica nego ICRF-193, pri čemu je zastoj kod NHF-K bio apsolutan, dok je kod NHF- $\Delta N$  mali broj stanica ipak ušao u mitozu.

Usporedno smo ispitali utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na ekspresiju i aktivnost čimbenika odgovora na oštećenje DNA (**Slika 26**). Ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  je značajno smanjena nakon 48 sati izlaganja bleomicinu i ICRF-u, dok je najviša kod kraćeg vremena izlaganja ICRF-u. Ekspresija



ciklina A ukazuje na razlike u proliferaciji između pojedinih uzoraka, a najviša je kod tretmana ICRF-om što je logično budući da je razina ovog ciklina najviša u fazi G2. Kod uzoraka duljeg izlaganja bleomicinu i ICRF-u dolazi do nestanka ciklina A kod NHF-K i NHF- $\Delta$ N (kod NHF- $\Delta$ N postoji jako slabi signal kod tretmana bleomicinom) što upućuje na izlazak stanica iz ciklusa (senescenciju). U skladu s tim, ekspresija inhibitora Cdk p27 (koji također ima ulogu u senescenciji) najviša je nakon duljeg izlaganja ICRF-u. To se slaže sa prethodno objavljenim rezultatima (Baus i sur., 2003), što pokazuje da p27 ima ulogu u senescenciji. Uočili smo i razlike u ekspresiji proteina p21 između NHF-K i NHF- $\Delta$ N: niža je kod NHF- $\Delta$ N nakon 16 sati izloženosti ICRF-u, odnosno 48 sati izlaganja bleomicinu, podudarno s uočenim povećanim udjelom mitozu kod stanica NHF- $\Delta$ N u odnosu na NHF-K (**Slika 25**).

Razina fosforiliranog Chk2 nešto je viša kod NHF- $\Delta$ N nakon tretmana bleomicinom, dok je kod tretmana ICRF-om smanjena (16 sati). Fosforilacija proteina Chk2 na položaju T68 jedan je od ranih markera oštećenja DNA, ali je brzo prolazna (Lossaint i sur., 2011), čemu možemo pripisati određene razlike kod kraćih tretmana s ICRF-193 i bleomicinom između NHF-K i NHF- $\Delta$ N.



**Slika 26: Utjecaj  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na ekspresiju regulatora staničnog ciklusa nakon izlaganja stanica NHF bleomicinu i ICRF-u.** Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N) i kontrolne stanice (K) izložene su djelovanju bleomicina (BL) u koncentraciji 10  $\mu$ g/mL i ICRF-a (IC) u koncentraciji 2  $\mu$ g/mL tijekom 16 i 48 sati nakon čega je provjerena ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , analizirana ekspresija ciklina A (cA), p27 i p21, odnosno fosforiliranog Chk2 na položaju T68 (P<sup>T68</sup>-Chk2). Zvezdica (\*) označava dulje vrijeme izlaganja membrane na film. KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

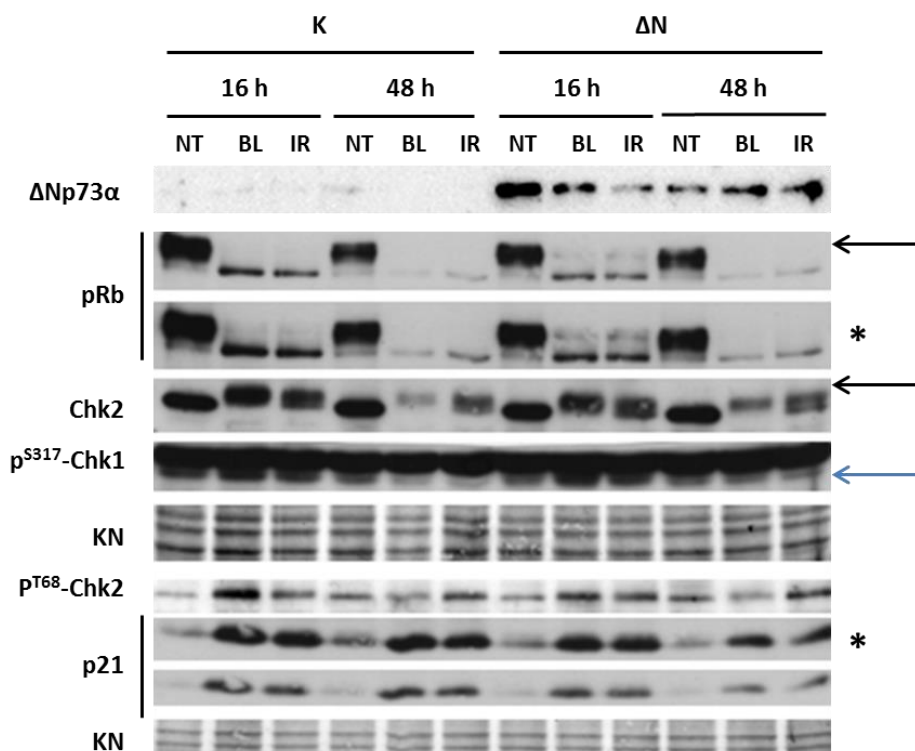
Na temelju ovih eksperimenata možemo zaključiti da  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u manjem dijelu stanica NHF remeti kontrolu staničnog ciklusa s jedne strane prekidajući zastoj u G2/M i

omogućavajući ulazak dijela stanica u mitozu (na temelju rezultata videomikroskopije, **Slika 25**), a s druge strane dovodeći do endoreplikacije kod stanica kod kojih uslijed produljenog zastoja u G2/M dolazi do preskakanja mitoze (vidljivo nakon dulje izloženosti ICRF-u (**Slika 14A i C**)).

#### **4.2.3. Usporedba utjecaja ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ na prevladavanje zastoja staničnog ciklusa nakon tretmana stanica NHF bleomicinom i $\gamma$ -zračenjem**

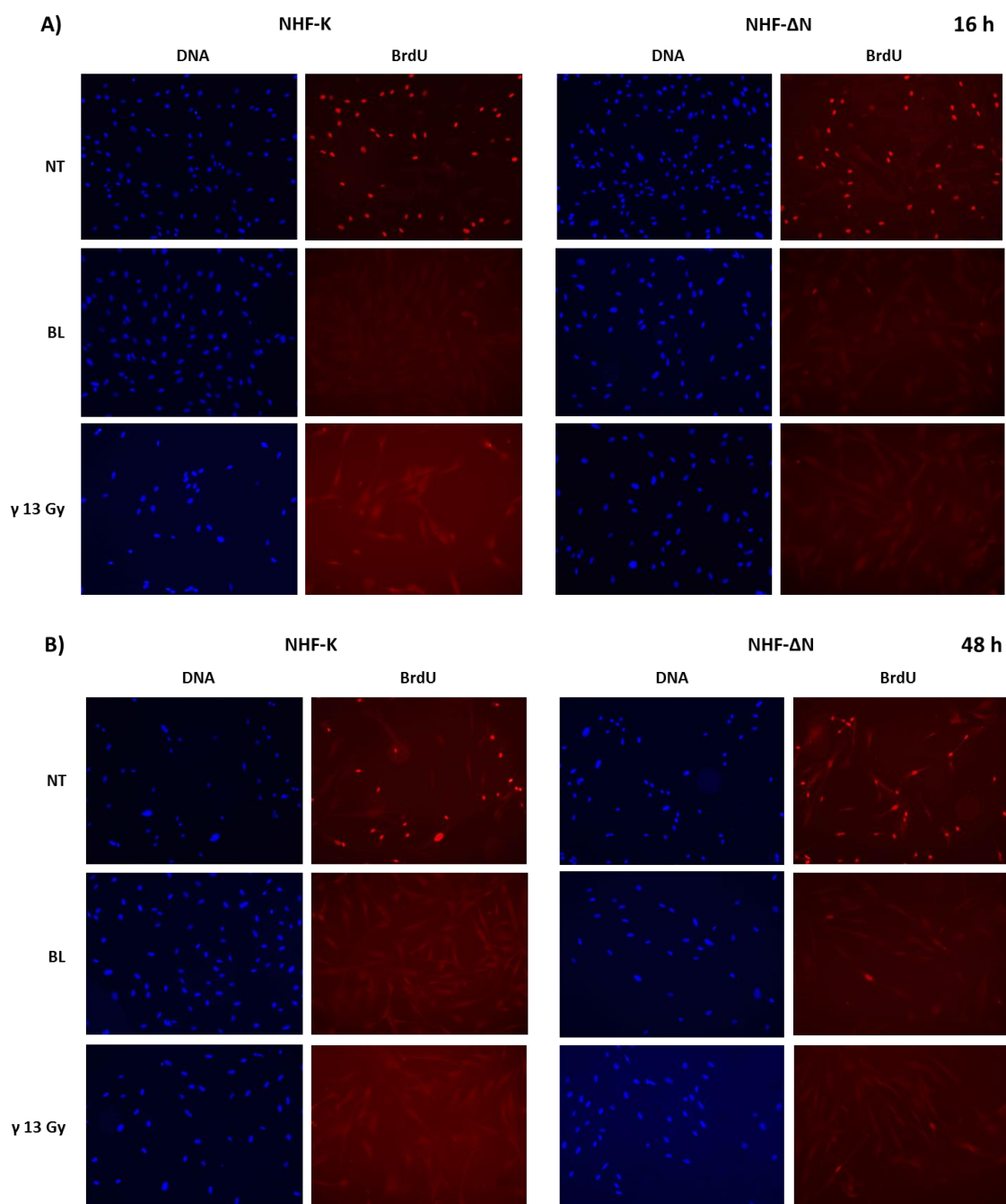
Željeli smo usporediti utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na stanični odgovor stanica NHF na tretman bleomicinom i  $\gamma$ -zračenjem. Jedna od razlika između ta dva genotoksična agensa je u prirodi tretmana. Kod bleomicina se radi o neprekidnoj (kroničnoj) izloženosti stanica oštećenju u određenom vremenskom razdoblju, dok se kod  $\gamma$ -zračenja stanice u kraćem periodu (akutni oblik) izlože određenoj dozi, te se učinak promatra nakon određenog vremena. Kao posljedica toga, stanice izložene djelovanju bleomicina podložne su jačem i trajnijem oštećenju DNA.

Stanice su sakupljene nakon 16 i 48 sati izlaganja bleomicinu, odnosno 16 i 48 sati nakon  $\gamma$ -zračenja dozom od 13 Gy. Western blot analiza pokazala je da ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do slabije aktivacije proteina pRb, budući da je 16 sati nakon oba tretmana uočena veća razina fosforiliranog pRb kod NHF- $\Delta N$  u odnosu na NHF-K (**Slika 27**). Razlike u ekspresiji proteina p21 vidljive su tek nakon 48 sati, razina p21 manja je kod NHF- $\Delta N$  kod oba tretmana, što smo već uočili i ranije (**Slike 20, 23 i 26**). Analiza ekspresije ukupnog Chk2 i fosforiliranosti na položaju T68 nije pokazala značajne razlike između NHF- $\Delta N$  i NHF-K. No, čini se da ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do pojačane fosforilacije Chk1 na položaju S317 (strelica, **Slika 27**).



**Slika 27: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na ekspresiju regulatora staničnog odgovora na oštećenje DNA nakon izlaganja stanica NHF bleomicinu i  $\gamma$ -zračenju.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) izložene su bleomicinu (BL) u koncentraciji 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , odnosno  $\gamma$ -zračenju doze 13 Gy ( $\gamma$ ). Sakupljene su nakon 16 i 48 sati, te je potom analizirana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$ , pRb, Chk2 i p21, odnosno fosforiliranost pRb i Chk2 (iz pomaka proteinskih vrpca) te pChk2 i pChk1 (korištenjem specifičnih fosfo-protutijela,  $P^{T68}$ -Chk2 i  $P^{S317}$ -Chk1). Zvezdica (\*) označava dulje vrijeme izlaganja membrane na film, crna strelica označava gornju proteinsku vrpcu koja odgovara fosforiliranom obliku pRb i Chk2, a plava specifičnu vrpcu fosforiliranog oblika Chk1. KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

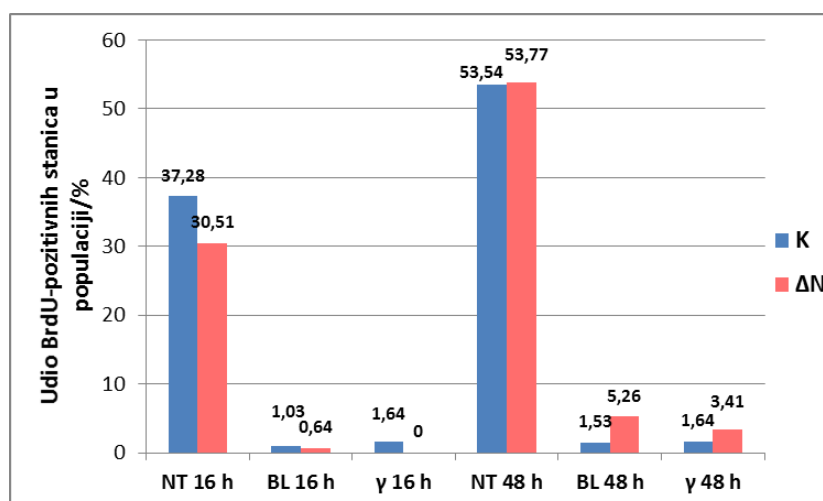
Da bi ispitali utječe li ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  na zastoj staničnog ciklusa u ovim stanicama usporedno smo analizirali ugradnju bromodeoksiuridina (BrdU) metodom imunofluorescencije, odnosno udio stanica koje su u promatranom razdoblju prošle kroz fazu S. Uzorci su sakupljeni u istim vremenskim intervalima kao u prethodnom pokusu Western blot analize (nakon 16 i 48 sati izlaganja bleomicinu, odnosno 16 i 48 sati nakon tretmana zračenjem). Uzorcima koje smo sakupili nakon 16 sati dodali smo BrdU u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  tijekom 1 sata prije sakupljanja da bi detektirali stanice koje su se u tom razdoblju nalazile u fazi S, odnosno replikaciji DNA. Uzorci koje smo sakupili nakon 48 sati bili su izloženi djelovanju Brdu tijekom 12 sati prije sakupljanja, te smo određivali broj stanica koje su promatranom razdoblju ušle u replikaciju DNA, odnosno uspjele prevladati zastoj ciklusa izazvan oštećenjem DNA (**Slika 28**).



**Slika 28: Utjecaj  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na ulazak u replikaciju stanica NHF ispitan ugradnjom bromodeoksiuridina nakon izlaganja bleomicinu i  $\gamma$ -zračenju. A)** Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N) i kontrolne stanice (K) tretirane su bleomicinom (BL) u koncentraciji 10  $\mu$ g/mL ili  $\gamma$ -zračenjem ( $\gamma$ ) doze 13 Gy, te su sakupljene nakon 16 sati zajedno s netretiranim stanicama (NT) pri čemu im je dodan BrdU u koncentraciji 10  $\mu$ M tijekom 1 sata. Korištenjem protutijela specifičnog za BrdU detektirali smo stanice koje su ugradile BrdU. Jezgre stanica vizualizirane su bojom Hoechst 33258. **B)** Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N) i kontrolne stanice (K) tretirane su bleomicinom (BL) u koncentraciji 10  $\mu$ g/mL i  $\gamma$ -zračenjem ( $\gamma$ ) doze 13 Gy, te su sakupljene nakon 48 sati zajedno s netretiranim stanicama (NT) pri čemu im je dodan BrdU u koncentraciji 10  $\mu$ M tijekom 12 sati prije sakupljanja. Korištenjem protutijela specifičnog za BrdU detektirane su stanice koje su ugradile BrdU. Jezgre stanica vizualizirane su bojom Hoechst 33258.

Usporedivši ugradnju BrdU kod stanica NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica uočili smo određene razlike (**Slika 29**). Kod stanica koje su bile tijekom 12 sati izložene ugradnji BrdU te sakupljene usporedno sa stanicama izloženim bleomicinu tijekom 48 sati ili ozračenim stanicama, nije bilo razlike u ugradnji BrdU između NHF-K i NHF- $\Delta N$ . Nasuprot tome, kod uzoraka izloženih tijekom 1 h BrdU (uzorci uzeti u isto vrijeme kad i 16-satni tretmani) ugradnja BrdU bila je nešto niža kod NHF- $\Delta N$ .

Tretmani bleomicinom i  $\gamma$ -zračenjem učinkovito zaustavljaju stanice NHF-K i NHF- $\Delta N$ , što se vidi iz gotovo potpunog izostanka ugradnje BrdU 16 h nakon zračenja odnosno 16-satnog izlaganja bleomicinu kod oba tipa stanica (**Slike 28A i 29**). Međutim, 48 h nakon tretmana  $\gamma$ -zračenjem i bleomicinom ipak dolazi do ugradnje BrdU kod manjeg broja stanica, nešto izrazitije kod NHF- $\Delta N$  u odnosu na kontrolne stanice (**Slike 28B i 29**). Tako je nakon 48 h izloženosti bleomicinu ugradnja BrdU kod NHF- $\Delta N$  5,26%, a kod NHF-K 1,53%, dok je 48 h nakon  $\gamma$ -zračenja kod NHF- $\Delta N$  3,41% u usporedbi sa 1,64% kod NHF-K.

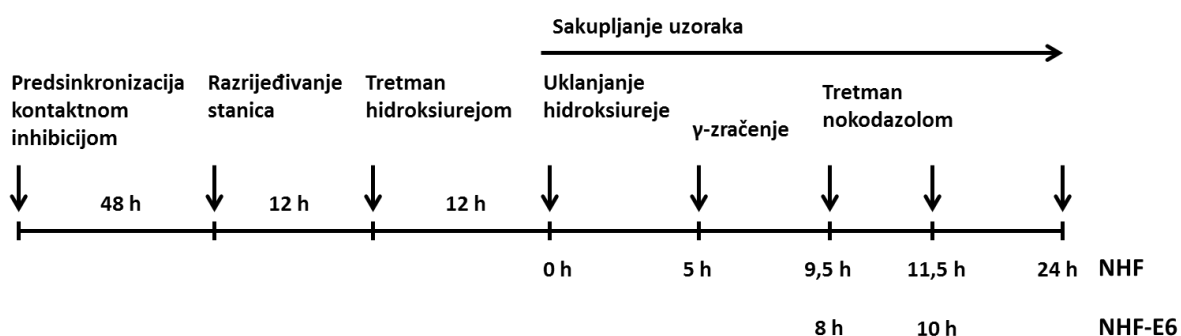


**Slika 29: Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  ulazak u replikaciju DNA u stanicama NHF nakon tretmana bleomicinom i  $\gamma$ -zračenjem.** Stanice NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) tretirane su bleomicinom (BL) u koncentraciji 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i  $\gamma$ -zračenjem ( $\gamma$ ) doze 13 Gy, te su sakupljene nakon 16, odnosno 48 sati pri čemu im je dodan BrdU u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$  tijekom 1, odnosno 12 sati prije sakupljanja. Korištenjem protutijela specifičnog za BrdU detektirane su stanice koje su ugradile BrdU. Jezgre stanica vizualizirane su bojom Hoechst 33258. Na osi Y prikazan je udio BrdU-pozitivnih stanica u ukupnoj populaciji stanica (određen nakon bojenja jezgri Hoechst-om).

Ti rezultati, u skladu sa onima prikazani na **slici 22**, potvrđuju da ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  u primarnim stanicama negativno utječe na funkciju puta p53-p21 iako ga ne može potpuno potisnuti.

#### 4.2.4. Utjecaj ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ na funkciju kontrolne točke G2/M u stanicama NHF i NHF-E6 nakon $\gamma$ -zračenja

Prethodni rezultati, ponajprije videomikroskopija nakon tretmana ICRF-om (*Slika 25*), kao i pojava poliploidije uslijed jake doze zračenja (*Slika 22*), ukazali su na mogući utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na regulaciju kontrolne točke G2/M. Kako bismo detaljnije ispitali tu ulogu, stanice smo sinkronizirali najprije kontaktnom inhibicijom u fazi G0, zatim hidroksiurejom (HU) na prijelazu G1/S, te smo ih ozračili nakon određenog vremenskog perioda od uklanjanja HU (kada je većina stanica u fazi S)(*Slika 30*). Uz pokuse na NHF koje eksprimiraju p53 divljeg tipa, željeli smo utvrditi utječe li  $\Delta Np73\alpha$  na tu kontrolnu točku i u stanicama u kojima je razina p53 drastično smanjena putem degradacije (NHF-E6).



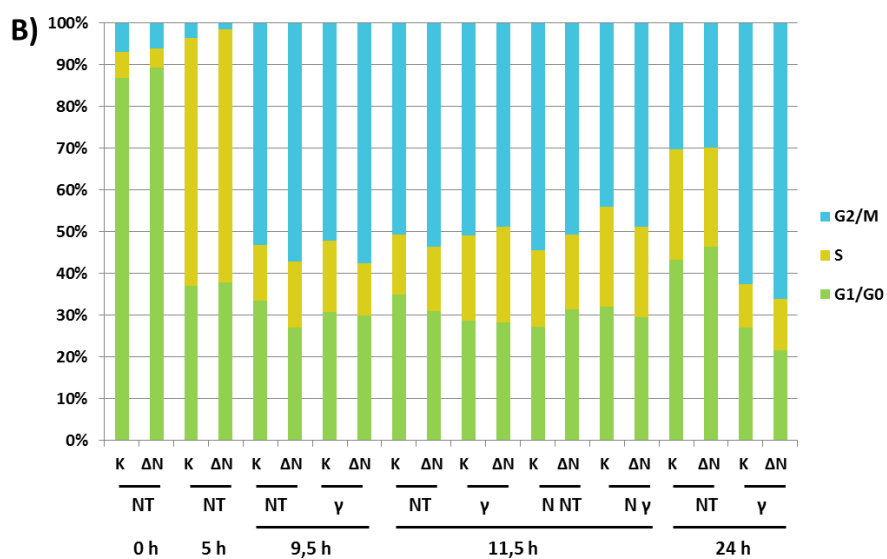
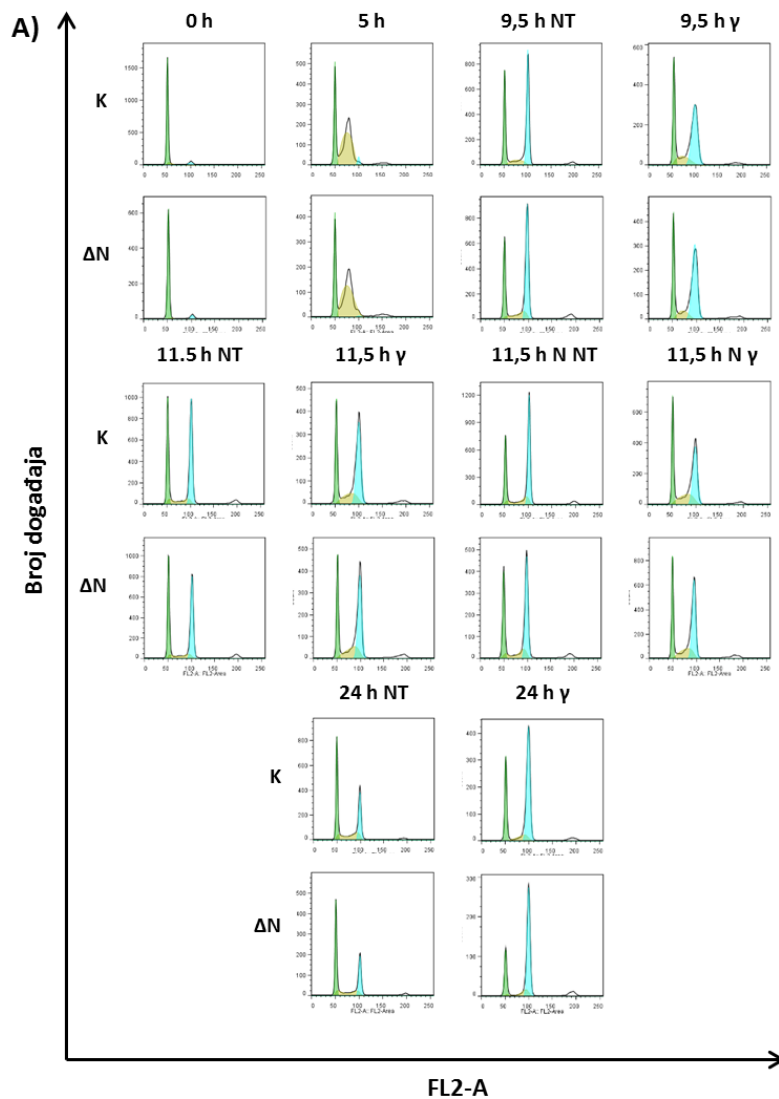
Slika 30: Shematski prikaz tijeka eksperimenta sinkronizacije stanica NHF, odnosno NHF-E6 i  $\gamma$ -zračenja

##### 4.2.4.1. NHF

Istraživanja smo najprije proveli na normalnim stanicama NHF u kojima je funkcionalan p53. Shema eksperimenta prikazana je na *slici 30*. Stanice smo najprije sinkronizirali kontaktnom inhibicijom u fazi G0, razrijedili presađivanjem te ih nakon 12 sati (tijekom faze G1) tretirali tijekom 12 sati hidroksiurejom zaustavljajući ih na prijelazu G1/S. Zatim smo uklonili HU, nakon 5 sati stanice ozračili dozom od 12 Gy, te ih sakupljali u određenim vremenskim razmacima. Kako bi „uhvatili“ stanice koje uđu u mitozu, stanice smo tretirali nokodazolom (zaustavlja stanice u mitozu inhibirajući formiranje diobenog

vretena) u trenutku kada smo primijetili ulazak prvih stanica u mitozu (9,5 sati nakon uklanjanja hidroksiureje).

Analiza raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa protočnom citometrijom, pokazala je približno jednaku uspješnost sinkronizacije stanica NHF-K i NHF- $\Delta$ N (**Slika 31**). Također, i povratak stanica u ciklus bio je slične dinamike kod oba tipa stanica, vidljivo u približno jednakoj raspodjeli stanica po fazama ciklusa 5 sati nakon uklanjanja HU, u trenutku kada je dio uzoraka ozračen dozom od 12 Gy. 9,5 sati nakon uklanjanja HU primijećene su manje razlike između NHF-K i NHF- $\Delta$ N. I ozračene i netretirane stanice NHF- $\Delta$ N imale su nešto veći udio 4N stanica u odnosu na pripadajuće kontrolne stanice. Iznenadujuće, udio stanica NHF-K i NHF- $\Delta$ N sa sadržajem DNA 4N bio je nešto manji kod ozračenih stanica izloženih nokodazolu u usporedbi sa ozračenim stanicama koje nisu bile izložene nokodazolu. Zračene stanice NHF- $\Delta$ N sakupljene 11,5 sati od uklanjanja HU prethodno tretirane tijekom 2 sata nokodazolom imaju veći udio stanica sa sadržajem DNA 4N u odnosu na NHF-K, dok je bez dodatka nokodazola u isto vrijeme obrnuta situacija. Ovom metodom nije moguće specifično razlikovati stanice koje se nalaze u G2 od onih u mitozu, no budući da sama mitozu traje kratko (0,5 - 1 sata), porast stanica sa sadržajem DNA 4N mogli bismo pripisati većem udjelu stanica u fazi G2. Zračene stanice NHF- $\Delta$ N i 24 sata nakon uklanjanja HU imaju veći udio 4N stanica od NHF-K. Jedno od mogućih objašnjenja je da je kod NHF-K početno veći udio stanica zaustavljen u fazi G1, što je vidljivo već 9,5 sati nakon uklanjanja HU. U prilog tome govori i podatak da je se u trenutku zračenja (5 sati nakon uklanjanja HU) znatan udio stanica još uvijek nalazio u fazi G1, te je moglo doći do aktivacije kontrolne točke G1/S nakon zračenja. Ovim eksperimentom pokazali smo da ektopična ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ne utječe na prevladavanje zastoja u kontrolnoj točki G2/M u stanicama NHF (**Slika 31**).



Opis slike na sljedećoj stranici

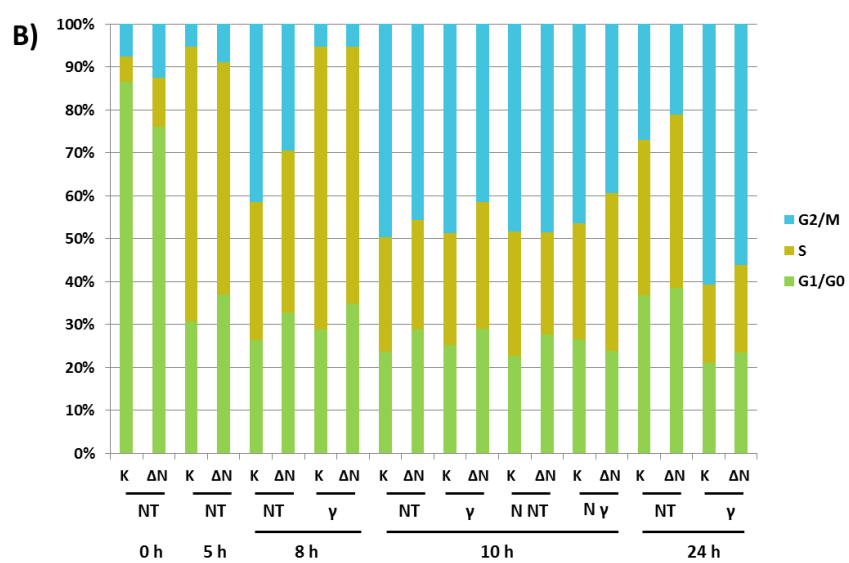
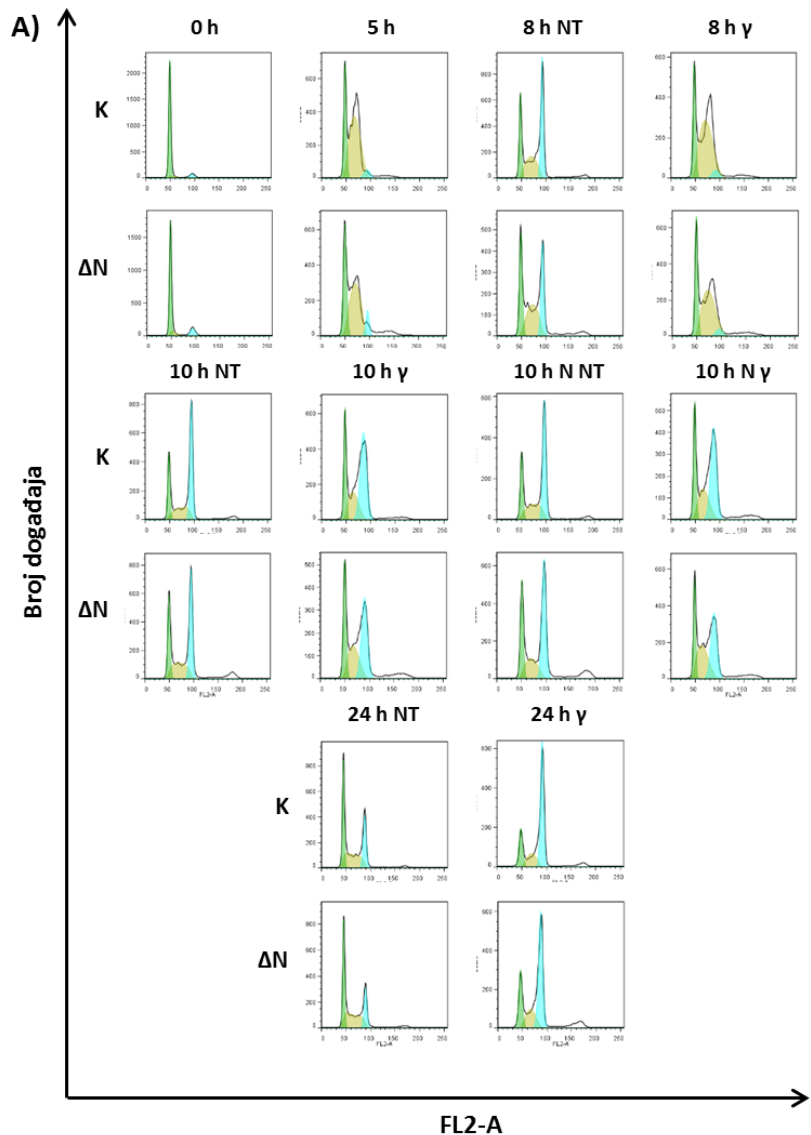


**Slika 31: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na prevladavanje kontrolne točke G2/M u stanicama NHF nakon  $\gamma$ -zračenja. A)** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (**K**) sinkronizirane su kontaktnom inhibicijom, a zatim hidroksiurejom (**HU**) u fazi G1/S. Protočnom citometrijom analizirana je raspodjela po fazama staničnog ciklusa nakon bojenja DNA propidij jodidom: u trenutku uklanjanja HU (**0 h**), 5 sati nakon uklanjanja HU (**5 h**), zatim 9,5 sati nakon uklanjanja HU netretiranim (**9,5 h NT**) i zračenim stanicama (**9,5 h  $\gamma$** ), 11,5 sati nakon uklanjanja HU netretiranim (**11,5 h NT**) i zračenim stanicama (**11,5 h  $\gamma$** ) sa i bez tretmana nokodazolom tijekom 2 sata prije sakupljanja (**11,5 h N NT**, odnosno **11,5 h N  $\gamma$** ), 24 sata nakon uklanjanja HU netretiranim (**24 h NT**) i zračenim stanicama (**24 h  $\gamma$** ). Os X prikazuje intenzitet crvene fluorescencije, odnosno količinu DNA (kanal FL2-A), a os Y broj događaja (stanica). **B)** Raspodjela stanica NHF s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica po fazama staničnog ciklusa nakon  $\gamma$ -zračenja.

#### **4.2.4.2. NHF-E6**

Isti eksperimentalni pristup primijenili smo i na stanice NHF-E6 (**Slika 30**). Kod kontrolnih stanica (NHF-E6-K) sinkronizacija je bila nešto učinkovitija, budući da imaju veći udio stanica u fazi G0/G1 (85,01%) u odnosu na stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (74,91%) (**Slika 32**). Pet sati nakon uklanjanja HU, udio stanica NHF-E6-K u G0/G1 manji je nego NHF-E6- $\Delta N$ , što bi mogla biti posljedica razlika u učinkovitosti sinkronizacije ili mogućeg bržeg povratka u ciklus stanica NHF-E6-K. Tijekom većine promatranih vremenskih razdoblja (do 24 sata od uklanjanja HU), netretirane stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  imale su nešto veći udio stanica u G0/G1 i manji u G2/M od kontrolnih stanica. Osam sati nakon uklanjanja HU ozračene stanice imaju sličnu raspodjelu stanica po fazama ciklusa kao nakon 5 sati (u vrijeme ozračivanja) što ukazuje na zastoje stanica u fazi S. Deset sati nakon oslobađanja od HU udio netretiranih stanica u fazi S jednak je kod NHF-E6-K i NHF-E6- $\Delta N$ , što ukazuje na približno jednako uspješno prevladavanje zastoja u fazi S kod oba tipa stanica. Dvadeset i četiri sata nakon uklanjanja HU kod tretmana  $\gamma$ -zračenjem do izražaja dolazi nakupljanje stanica u G2/M, nešto jače izraženo kod NHF-E6-K u odnosu na NHF-E6- $\Delta N$  koje pritom imaju veći udio stanica u fazi G1 (**Slika 32**). Povrh toga, primijetili smo veću populaciju tetraploidnih stanica u NHF-E6- $\Delta N$  (**Slika 32A**).

Iz navedenog možemo zaključiti da  $\Delta Np73\alpha$  u promatranim eksperimentalnim uvjetima (visoka doza zračenja i kratko promatrano razdoblje), čak ni u odsutnosti p53, ne može značajnije narušiti kontrolnu točku G2/M.



Opis slike na sljedećoj stranici

**Slika 32: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na prevladavanje kontrolne točke G2/M u stanicama NHF-E6 nakon  $\gamma$ -zračenja.** A) Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice ( $K$ ) sinkronizirane su kontaktnom inhibicijom, a zatim hidroksiurejom ( $HU$ ) u fazi G1/S. Protočnom citometrijom analizirana je raspodjela po fazama staničnog ciklusa nakon bojenja DNA propidij jodidom: u trenutku uklanjanja HU (**0 h**), 5 sati nakon uklanjanja HU (**5 h**), zatim 8 sati nakon uklanjanja HU netretiranim (**8 h NT**) i zračenim stanicama (**8 h  $\gamma$** ), 10 sati nakon uklanjanja HU netretiranim (**10 h NT**) i zračenim stanicama (**10 h  $\gamma$** ) sa i bez tretmana nokodazolom tijekom 2 sata prije sakupljanja (**10 h N NT**, odnosno **10 h N  $\gamma$** ), 24 sata nakon uklanjanja HU netretiranim (**24 h NT**) i zračenim stanicama (**24 h  $\gamma$** ). Os X prikazuje intenzitet crvene fluorescencije, odnosno količinu DNA (kanal FL2-A), a os Y broj događaja (stanica). B) Raspodjela NHF-E6 stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica po fazama staničnog ciklusa nakon  $\gamma$ -zračenja.

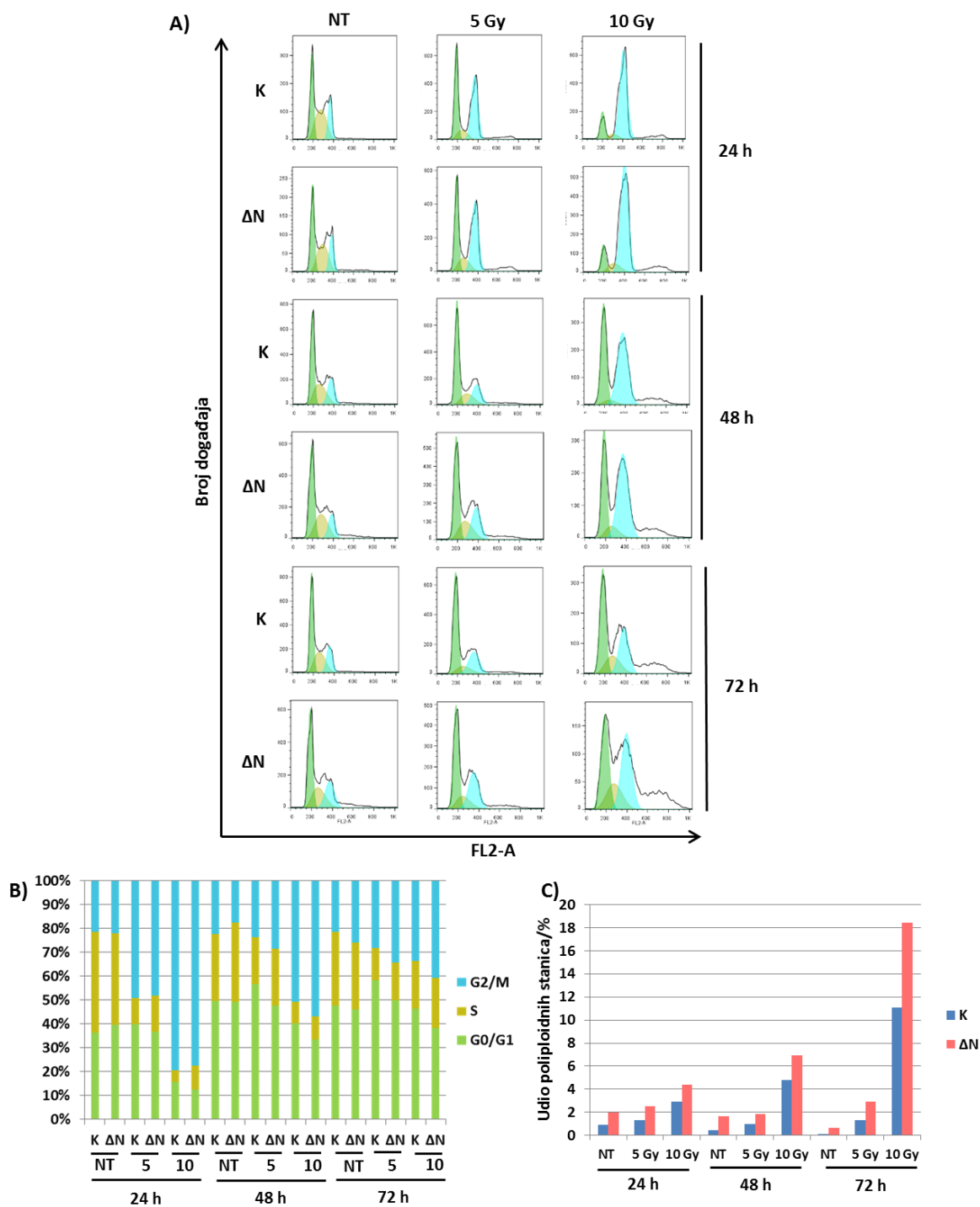
### **4.3. Uloga ektopične ekspresije $\Delta Np73\alpha$ u odgovoru stanica U2OS na oštećenje DNA**

Kao što smo već opisali, izoforma  $\Delta Np73\alpha$  djeluje kao dominantno-negativni inhibitor proteina p53 te smanjuje indukciju transkripcije ciljnih gena proteina p53, između ostalih i p21. Budući da je uloga p53 u odgovoru na oštećenje DNA u stanicama U2OS već narušena zbog nedovoljne aktivacije djelovanjem ATM, zanimalo nas je kako će ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  utjecati na taj odgovor. Iz naših je pokusa očito da u normalnim (netransformiranim stanicama), u kojima je funkcija p53 potpuna (NHF),  $\Delta Np73\alpha$  ne utječe na zastoje u G2/M iako izaziva poliploidiju u dijelu populacije. Iz toga proizlazi da u tim stanicama ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  nije dostatna da učinkovito spriječi funkciju p53. S druge strane, u stanicama bez p53 (NHF-E6) isto nismo primijetili značajan učinak ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na regulaciju staničnog ciklusa uslijed oštećenja DNA. To možda nije iznenađujuće, jer su se te stanice „prilagodile“ na druge signalne puteve (Reinhardt i sur., 2007). Stoga smo odlučili ispitati utječe li  $\Delta Np73\alpha$  na odgovor na oštećenje DNA u stanicama U2OS, koje ekspimiraju divlji tip p53, no njegova uloga je oslabljena zbog nedovoljne aktivacije ATM (Lossaint i sur., 2011) ili prisustva mutirane fosfataze Wip1 (Kleiblova i sur., 2013). Predloženo je da je odsutnost zastoja u G1 uslijed oštećenja DNA posljedica nedostatne indukcije p21. Pretpostavili smo da bi u U2OS stanicama ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  mogla „pogoršati“ njihov odgovor na oštećenje DNA (ili neke njegove aspekte).

### 4.3.1. Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na kontrolu staničnog ciklusa u stanicama U2OS nakon $\gamma$ -zračenja

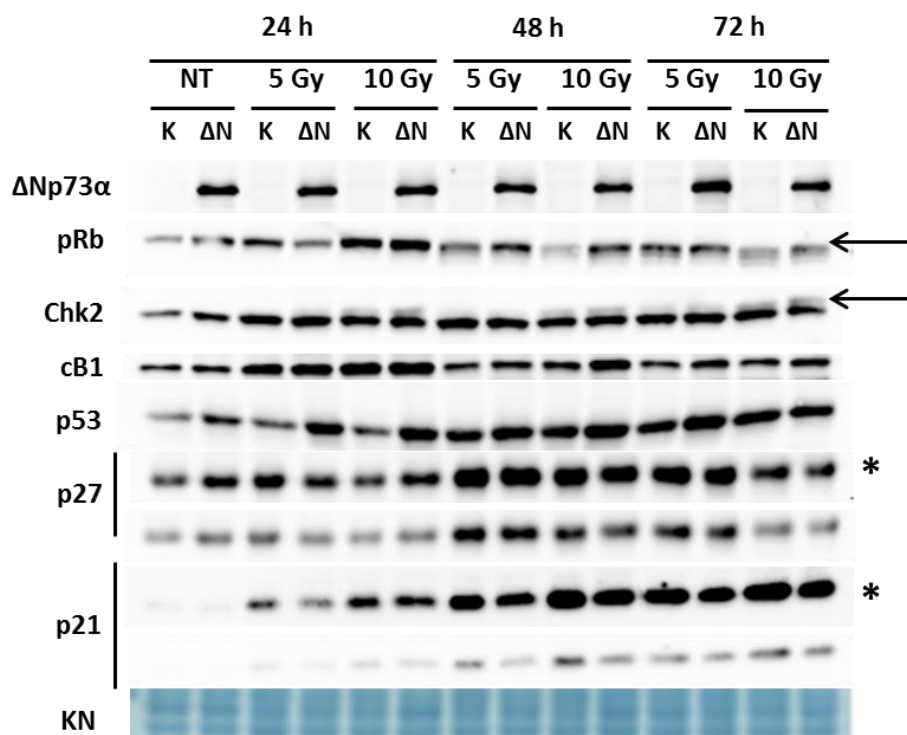
Stanice smo ozračili dozama od 5 i 10 Gy te nakon 24, 48 i 72 sati protočnom citometrijom analizirali raspodjelu stanica po fazama ciklusa. Slično kao što je bio slučaj i kod NHF, tretman dozom od 5 Gy uzrokuje zastoj u G1 i G2, dok doza od 10 Gy prouzrokuje uglavnom zastoj u G2 (**Slika 33A**). Štoviše, zastoj stanica u kontrolnoj točki G2/M nakon tretmana dozom od 5 Gy bio je prolazan u odnosu na dozu od 10 Gy (vidljivo iz povećanog udjela stanica sa sadržajem DNA 4N 24 sata nakon zračenja) (**Slika 33**). U skladu s tim, razine fosforiliranosti pRb i ekspresije p21 bile su niže kod stanica ozračenih dozom od 5 Gy u odnosu na 10 Gy 24 sata nakon zračenja (**Slika 34**). Pritom smo kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  nakon zračenja dozom od 5 Gy uočili nižu razinu fosforiliranog pRb, te ekspresije p21 i p27 u odnosu na kontrolne stanice.

48 sati nakon tretmana dozom od 5 Gy više nije naglašen zastoj u G2/M, što upućuje na to da je ipak većina zaustavljenih stanica uspjela ući u mitozu. No, nasuprot kontrolnim stanicama, koje su (većinom) zaustavljene u G1 (indukcija p21), primijetili smo veći udio stanica sa sadržajem DNA 4N kod ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  48 i 72 sati nakon zračenja (**Slika 33A i B**). Doza od 10 Gy izazvala je snažniji zastoj u kontrolnoj točki G2/M. I u ovom slučaju, udio stanica sa sadržajem DNA 4N se smanjio 48, odnosno 72 sata nakon zračenja što upućuje da je dio stanica ipak uspio prevladati zastoj u G2 i proći u mitozu. To smo zaključili na temelju porasta udjela stanica sa sadržajem 2N nakon 48 i 72 sata u odnosu na 24 sata. Zanimljivo, 48 sati nakon zračenja dozom od 10 Gy primijetili smo blagi porast udjela stanica sa sadržajem DNA većim od 4N (poliploidija), što je osobito došlo do izražaja 72 sata nakon zračenja (**Slika 33A i C**). Pritom, udio poliploidnih stanica bio je znatno veći kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ . Istodobno, razina fosforiliranog pRb bila je viša kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne stanice, što upućuje na smanjeni izlazak iz staničnog ciklusa kod stanica U2OS- $\Delta N$ .



**Slika 33: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na raspodjelu stanica U2OS po fazama staničnog ciklusa nakon  $\gamma$ -zračenja.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) ozračene su dozama 5 i 10 Gy, sakupljene zajedno s netretiranim stanicama (NT) nakon 24, 48 i 72 sata, te je protočnom citometrijom analizirana raspodjela stanica po fazama ciklusa nakon bojenja DNA propidij jodidom. **A)** Histogrami raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa. Na osi X prikazan je intenzitet crvene fluorescencije, proporcionalan količini DNA (kanal FL2-A), a na osi Y broj događaja (analiziranih stanica). **B)** Raspodjela stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih po fazama staničnog ciklusa nakon  $\gamma$ -zračenja. **C)** Udio poliploidnih stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  te kontrolnih stanica nakon  $\gamma$ -zračenja.

Do značajnije indukcije p21 dolazi tek 48 sati nakon zračenja, pri čemu je razina ekspresije bila općenito niža kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne stanice u svim promatranim razdobljima i nakon tretmana s obje doze. Istodobno, ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovela je do više razine ekspresije p53 u odnosu na kontrolne stanice. Ekspresija ciklina B1 viša je kod U2OS- $\Delta N$  48 i 72 sata poslije zračenja u odnosu na U2OS-K, no općenito niža u odnosu na razdoblje 24 sata nakon zračenja. Ipak, možemo uočiti značajnu razliku u odnosu na stanice NHF tretirane na isti način (**Slika 23**). Dok je kod stanica NHF već 48 sati nakon zračenja (osobito izraženo pri dozi od 10 Gy) došlo do drastičnog smanjenja razine ciklina B1 (i ciklina A), kod stanica U2OS smanjenje nije bilo tako drastično te je čak i nakon 72 sata (kod obje doze zračenja) bila prisutna ekspresija ciklina B1. To je vjerojatno posljedica nepotpunog izlaska tih stanica iz staničnog ciklusa, pri kojem dolazi do razgradnje tih proteina kao i supresije njihove ekspresije putem pRb (Gire i Dulić, 2015).

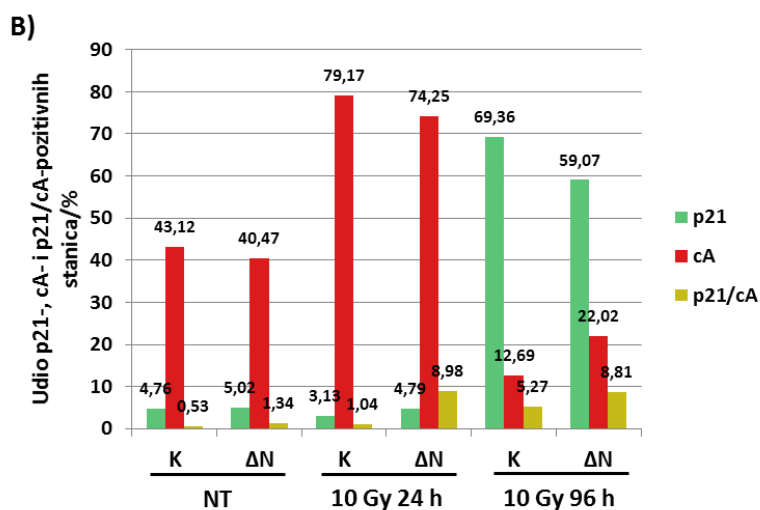
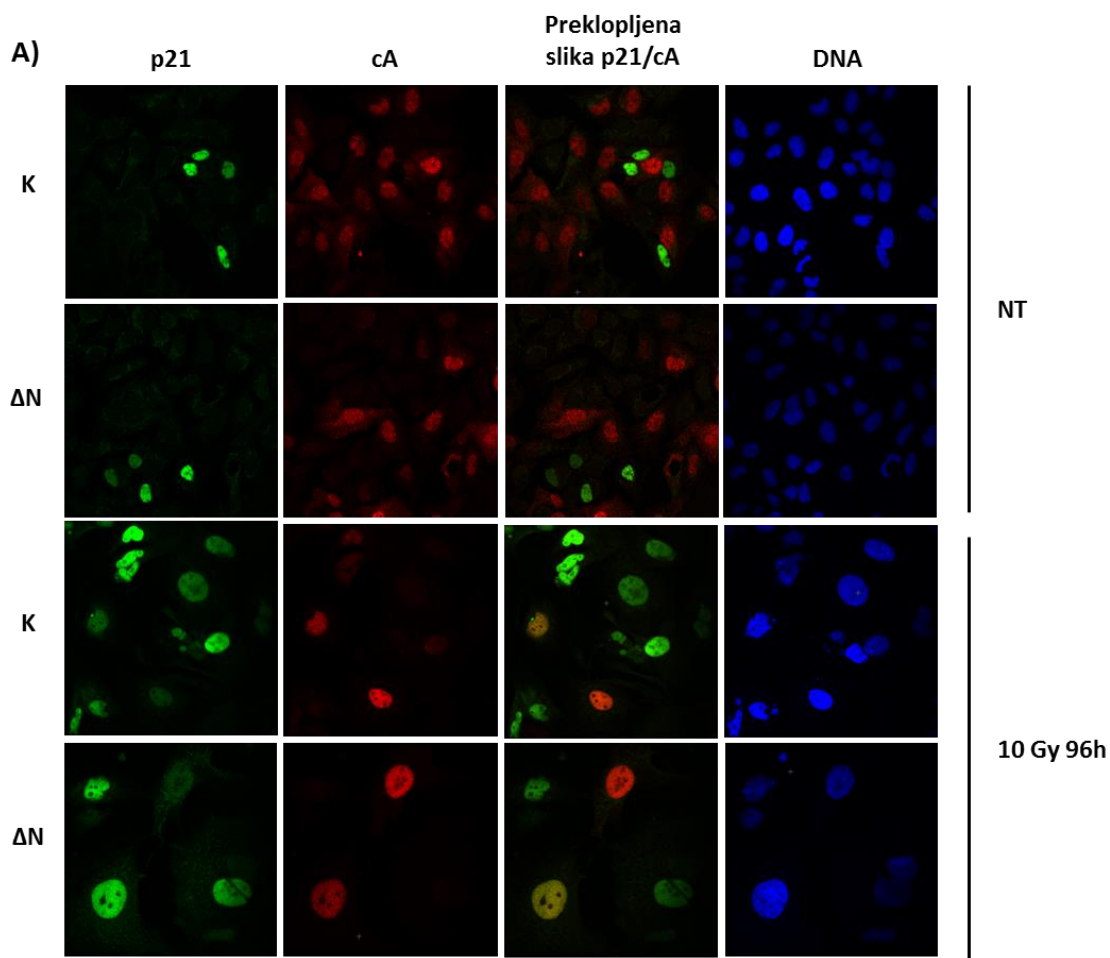


**Slika 34:** Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na ekspresiju glavnih regulatora staničnog ciklusa i odgovora na oštećenje DNA u stanicama U2OS nakon tretmana  $\gamma$ -zračenjem. Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) ozračili smo s 5 i 10 Gy, sakupili nakon 24, 48 i 72 sata, provjerili ekspresiju  $\Delta Np73\alpha$ , te analizirali ekspresiju proteina pRb, Chk2, cB1, p53, p27 te p21. Strelice označavaju gornji fosforilirani oblik proteina pRb i Chk2, a zvjezdica (\*) dulje vrijeme izlaganja membrane na film. KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

### 4.3.2. Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na izlazak iz ciklusa stanica U2OS nakon $\gamma$ -zračenja

Prethodni eksperiment ukazao je na negativni utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na izlazak stanica U2OS iz ciklusa nakon oštećenja DNA izazvanog  $\gamma$ -zračenjem. To se može zaključiti na temelju više razine ciklina B1, niže razine p21, povišene fosforilacije pRb te porasta udjela poliploidnih stanica pri duljim vremenskim razdobljima nakon zračenja kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (**Slike 33 i 34**). Budući da Western blot analiza ne daje informaciju o populaciji stanica koje ostaju u ciklusu (da bi potvrdili ove rezultate i zaključke), odlučili smo usporediti ekspresiju ciklina A i p21 u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnim stanicama putem imunofluorescencije. Uz procjenu udjela populacije koji je izašao iz ciklusa, taj pristup omogućuje povezivanje (na razini pojedinačnih stanica) utjecaja ekspresije jednog proteina (p21) na ekspresiju (i/ili lokalizaciju) drugog (ciklin A).

Stanice smo ozračili dozom od 10 Gy, sakupili nakon 24 i 96 sati te odredili ekspresiju p21 i ciklina A metodom imunofluorescencije (**Slika 35A**). Očekivano, 24 sata nakon zračenja veći broj stanica ekspresira ciklin A u odnosu na netretirane stanice (**Slika 35A i B**), budući da su u to vrijeme stanice zaustavljene u kontrolnoj točki G2/M (**Slika 33A**). Pritom nije došlo do značajnog povećanja udjela stanica koje ekspresiraju p21, u skladu s prethodnim rezultatima koji su pokazali sporu indukciju p21 nakon oštećenja DNA (**Slika 34**). 96 sati nakon zračenja došlo je do smanjenja udjela stanica koje ekspresiraju ciklin A, što upućuje na izlazak tih stanica iz ciklusa uslijed produljenog zastoja. Pritom je udio stanica koje ekspresiraju ciklin A bio veći kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (22,02%) u odnosu na kontrolne stanice (12,69%), na temelju čega možemo zaključiti da  $\Delta Np73\alpha$  remeti izlazak stanica iz ciklusa. Istodobno smo uočili manji udio stanica koje nakon 96 sati od zračenja ekspresiraju p21 kod ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  (59,07%) u odnosu na kontrolu (69,36%) (**Slika 35B**). Također, udio stanica koje istovremeno ekspresiraju ciklin A i p21 bio je veći kod U2OS- $\Delta N$  u usporedbi s U2OS-K.

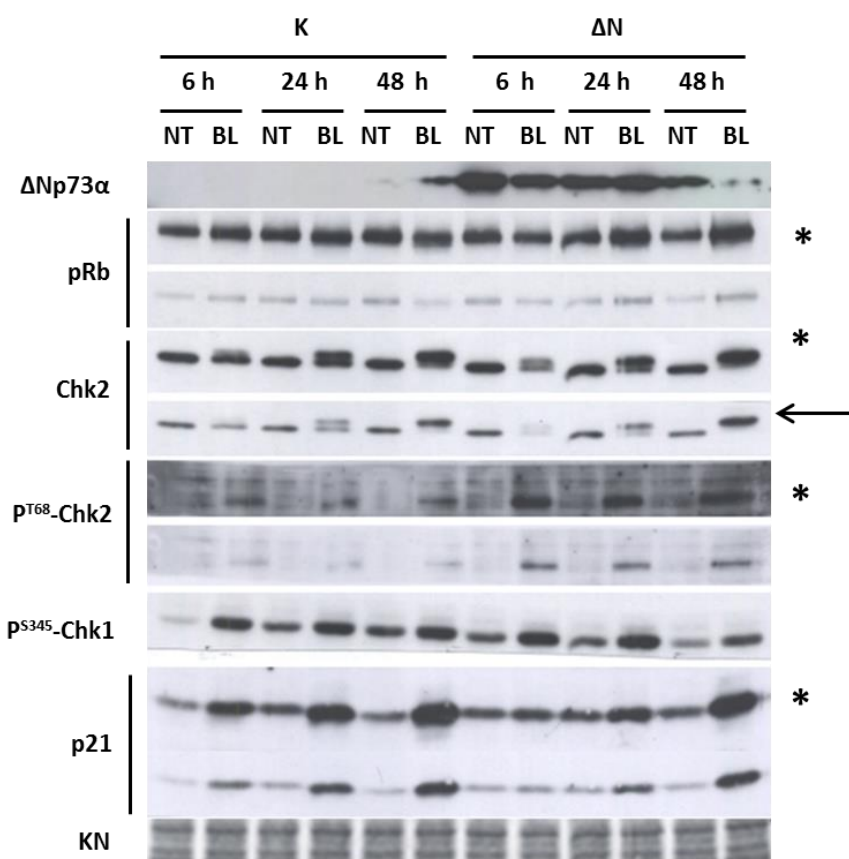


**Slika 35: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na ekspresiju p21 i ciklina A u stanicama U2OS nakon  $\gamma$ -zračenja dozom od 10 Gy.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) ozračene su dozom od 10 Gy te je nakon 24 i 96 sati analizirana ekspresija p21 (zeleno) i ciklina A (cA, crveno). **A)** Ekspresija p21 i ciklina A. Stanična DNA vizualizirana je bojom Hoechst 33258. **B)** Usporedba ekspresije p21 i ciklina A u stanicama U2OS nakon  $\gamma$ -zračenja. Određen je udio stanica koje su pokazale ekspresiju p21, ciklina A te istodobno p21/cA u ukupnoj populaciji stanica određenoj na temelju bojenja jezgara pomoću Hoechst 33258. Brojevi iznad stupaca histograma prikazuju postotak p21-, cA- odnosno p21/cA-pozitivnih stanica u ukupnoj populaciji.



### 4.3.3. Utjecaj $\Delta$ Np73 $\alpha$ na ekspresiju regulatora odgovora na oštećenje DNA izazvano bleomicinom

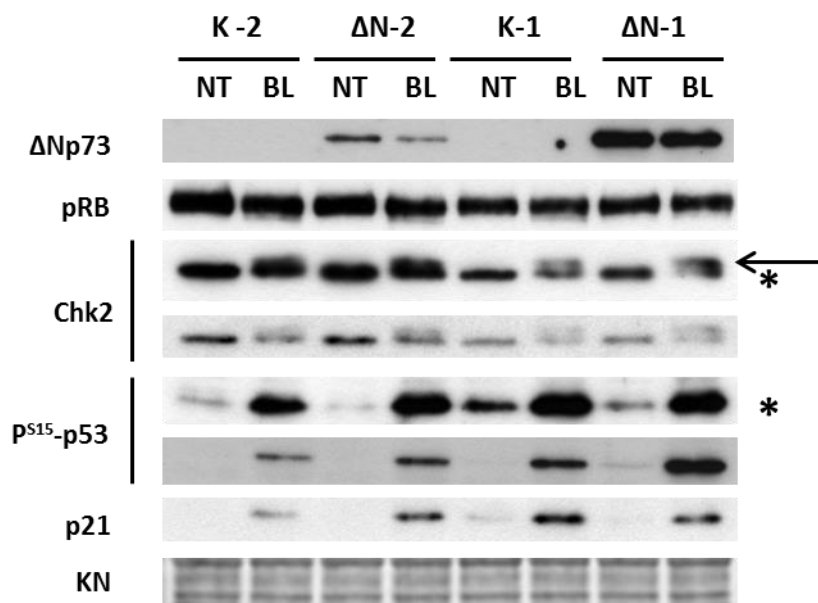
Kako bi proširili ispitivanje utjecaja  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na ekspresiju i aktivnost glavnih regulatora odgovora na oštećenje DNA u stanicama U2OS proveli smo tretman bleomicinom.



**Slika 36: Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta$ Np73 $\alpha$  na ekspresiju i aktivnost regulatora staničnog ciklusa u stanicama U2OS nakon tretmana bleomicinom.** A) Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ( $\Delta$ N), odnosno kontrolne stanice (K) izložene su djelovanju bleomicina (BL) u koncentraciji 10  $\mu$ g/mL, sakupljene nakon 6, 24 i 48 sati tretmana, zajedno s netretiranim stanicama (NT). Korištenjem specifičnih primarnih protutijela analizirana je ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , pRb, Chk2 i p21, te razina fosforiliranosti Chk2 i Chk1 korištenjem specifičnih primarnih fosfo-protutijela (p<sup>T68</sup>-Chk2 i p<sup>S345</sup>-Chk1) ili pomoću pomaka proteinskih vrpca dobivenog korištenjem protutijela za ukupni protein (Chk2). Na temelju pomaka proteinskih vrpca Chk2 odredili smo je li protein fosforiliran (strelica označava gornju proteinsku vrpcu koja odgovara fosforiliranom obliku proteina). Zvezdica (\*) označava dulje vrijeme izlaganja membrane na film. KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

Nakon retrovirusne infekcije stanice smo izložili djelovanju bleomicina i sakupili nakon 6, 24 i 48 sati tretmana. Western blot analizom ispitali smo ekspresiju  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i najvažnijih proteina uključenih u odgovor na oštećenje DNA, te u nekim slučajevima (Chk1 i

Chk2) i razinu njihove fosforiliranosti. Ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do brže i snažnije fosforilacije Chk2 što smo dokazali koristeći dva različita protutijela (specifično fosfo-protutijelo koje prepoznaje fosforilaciju na položaju T68 te protutijelo za ukupni protein koje bolje detektira pomak) (**Slika 36**). Nasuprot tome, stupanj fosforilacije Chk1 na položaju S345, važne u njegovoj aktivaciji, u početku (6 i 24 sata) je bio približno jednak kod oba tipa stanica, dok je nakon 48 sati tretmana niži kod U2OS- $\Delta N$ . Razina proteina p21 je nakon kraćih tretmana (6 i 24 sata) bleomicinom niža u U2OS- $\Delta N$ , dok nakon 48 sati dosiže razinu ekspresije u kontrolnim stanicama. Ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do ektopične fosforilacije pRb nakon izlaganja bleomicinu, što je u skladu sa rezultatima dobivenim na ozračenim NHF.



**Slika 37: Utjecaj razine ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na odgovor na oštećenje DNA u stanicama U2OS.** Stanice U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  iz dvije nezavisne retrovirusne infekcije ( $\Delta N-1$  i  $\Delta N-2$ ) kao i kontrolne stanice (**K-1** i **K-2**) izložene su 24 sata djelovanju bleomicina (**BL**) u koncentraciji 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nakon čega je analizirana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$ , pRb, Chk2 i p21, kao i fosforiliranog p53 korištenjem specifičnog fosfo-protutijela ( $P^{S15}$ -p53) te Chk2 na temelju pomaka proteinskih vrpca korištenjem protutijela za ukupni protein. Zvezdica (\*) označava dulje vrijeme izlaganja membrane na film, a strelice označavaju gornju proteinsku vrpcu koja odgovara fosforiliranom obliku Chk2. **KN** - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

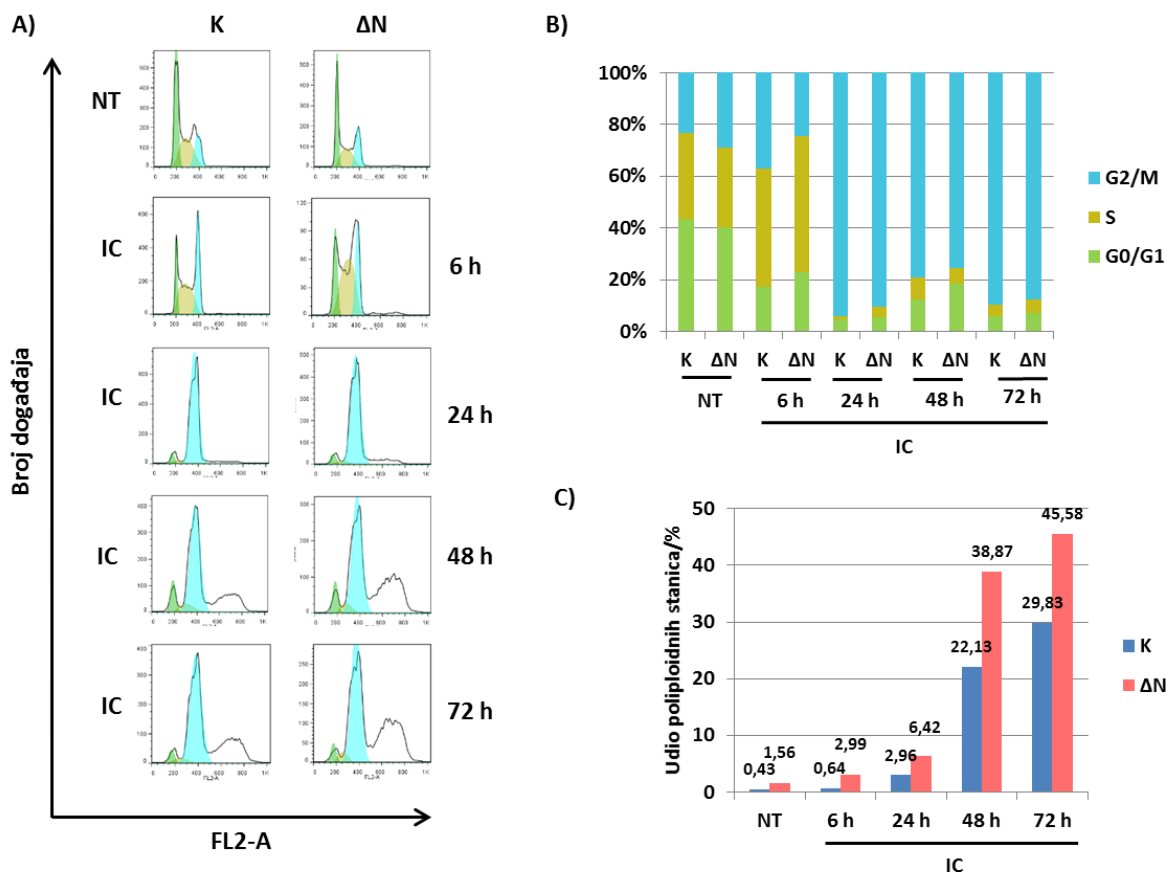
Kada smo usporedili utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na ekspresiju glavnih regulatora odgovora na oštećenje DNA u stanicama U2OS iz dvije nezavisne retrovirusne infekcije, s različitom učinkovitošću ekspresije  $\Delta Np73\alpha$ , vidjeli smo da se jačina utjecaja bitno razlikuje (**Slika 37**). Razina ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  znatno se razlikovala između dvije retrovirusne infekcije, pri čemu su stanice s višom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  pokazale jači učinak na odgovor stanica na tretman bleomicinom. Kod stanica s višom razinom  $\Delta Np73\alpha$  uočili smo veći utjecaj na ekspresiju (niži

p21) odnosno fosforiliranost (jača fosforilacija Chk2, pRb i p53) čimbenika odgovora na oštećenje DNA u odnosu na stanice s nižom razinom  $\Delta Np73\alpha$  nakon tretmana bleomicinom. Kod stanica U2OS- $\Delta N$ -1 razina ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  bila je znatno viša, te je stoga i utjecaj njegove ektopične ekspresije na različite čimbenike odgovora na oštećenje DNA bio veći nego kod U2OS- $\Delta N$ -2 (jača fosforilacija Chk2, p53 te pRb; niža razina p21 u odnosu na odgovarajuće kontrolne stanice). Na temelju toga, zaključili smo kako je utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na stanični odgovor na oštećenje DNA izazvano bleomicinom ovisan o količini prisutnog proteina, odnosno učinkovitosti retrovirusne infekcije stanica.

#### **4.3.4. Utjecaj $\Delta Np73\alpha$ na prevladavanje zastoja u G2/M nakon tretmana ICRF-om**

Zbog pojačane poliploidije kod stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  izloženih genotoksičnim agensima, što upućuje na uključenost ove izoforme u narušavanju funkcije kontrolne točke G2/M odgovora na oštećenje DNA, odlučili smo proširiti istraživanje korištenjem ICRF-193.

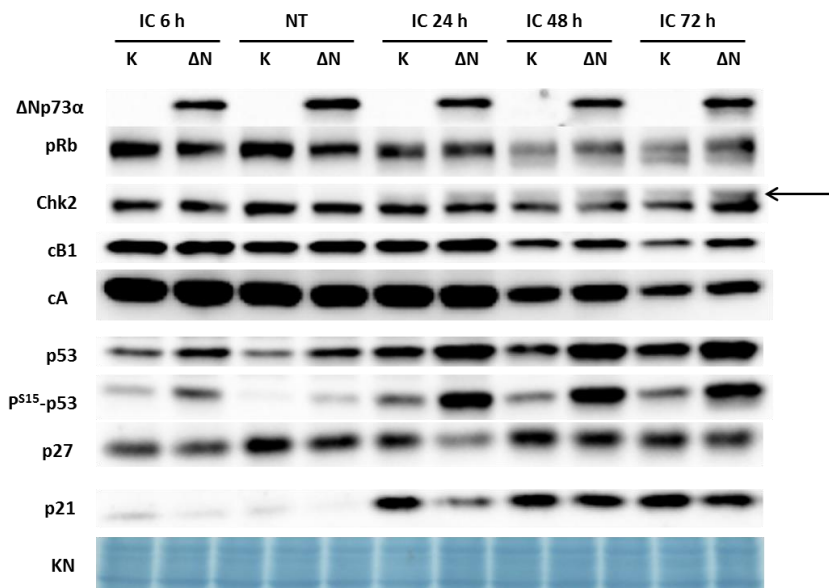
Stanične kulture izložili smo djelovanju ICRF-a te analizirali raspodjelu stanica po fazama staničnog ciklusa nakon 6, 24, 48 i 72 sata tretmana (**Slika 38**). Nakon 24 sata izloženosti djelovanju ICRF-a naglašen je zastoj ciklusa u kontrolnoj točki G2/M i kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kod kontrolnih stanica. Nakon 48 sati izloženosti djelovanju ICRF-a udio poliploidnih stanica bio je znatno viši kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (38,87%) u odnosu na kontrolne (22,13%), i dodatno je porastao nakon produljenog (72 sata) tretmana (**Slika 38C**). Štoviše, ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  znatno je promijenila profil staničnog ciklusa već nakon 6 sati.



**Slika 38: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na raspodjelu stanica U2OS po fazama staničnog ciklusa nakon tretmana ICRF-om.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) izložene su djelovanju ICRF-a (IC) u koncentraciji 2  $\mu\text{g/mL}$ , sakupljene zajedno s netretiranim stanicama (NT) nakon 6, 24, 48 i 72 sata, te je analizirana raspodjela stanica po fazama ciklusa protočnom citometrijom nakon bojenja DNA propidij jodidom. **A)** Histogrami raspodjele stanica po fazama staničnog ciklusa. Na osi X prikazan je intenzitet crvene fluorescencije, proporcionalan količini DNA (kanal FL2-A), a na osi Y broj događaja, odnosno analiziranih stanica. **B)** Raspodjela stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih po fazama staničnog ciklusa nakon tretmana ICRF-om. **C)** Udio poliploidnih stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih nakon tretmana ICRF-om. Brojevi iznad stupaca histograma prikazuju postotak poliploidnih stanica u ukupnoj populaciji stanica.

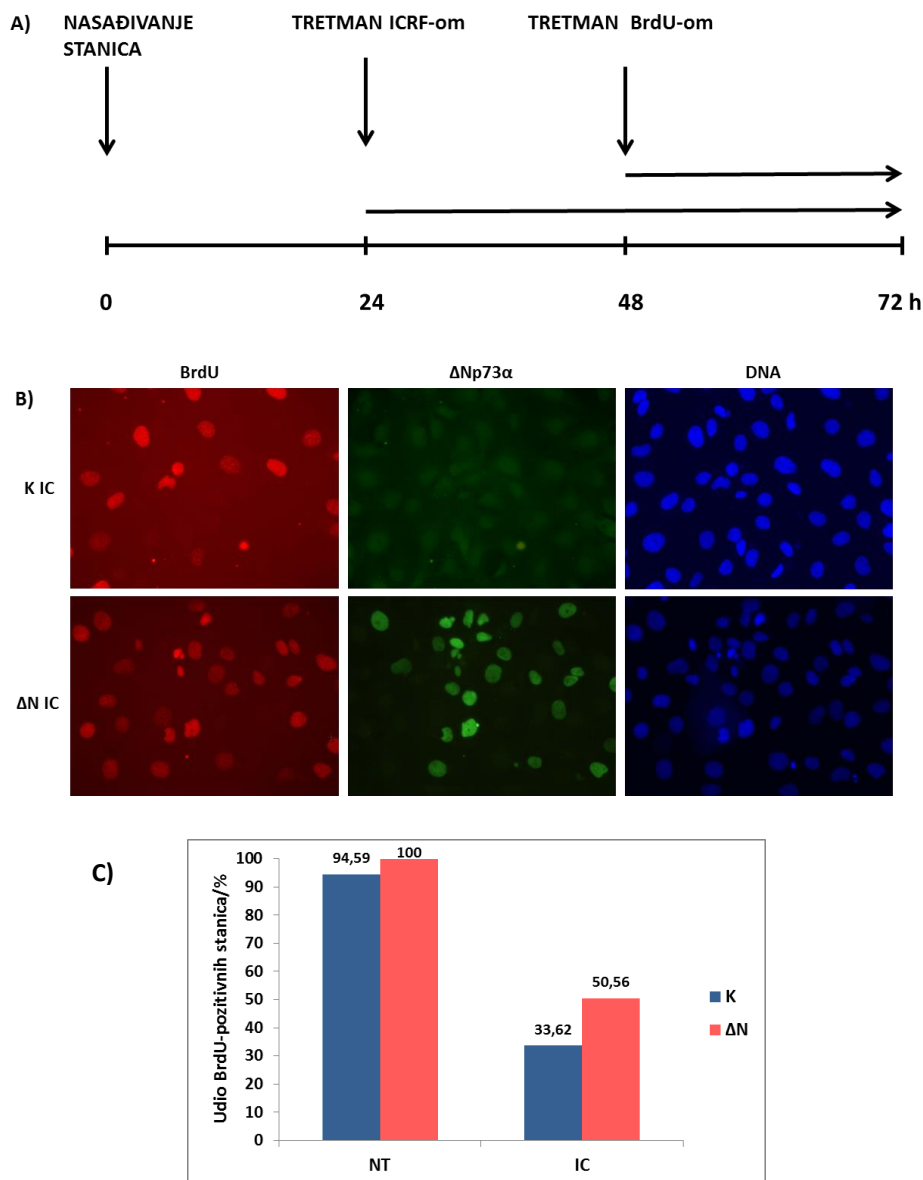
Razina fosforiliranog pRb viša je kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne nakon 48 i 72 sata izloženosti djelovanju ICRF-a. Fosforilacija Chk2 nakon izloženosti djelovanju ICRF-a je slaba, pojavljuje se 24 sata nakon izloženosti djelovanju ICRF-a, i nešto je jača kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u usporedbi s kontrolnim stanicama. Nakon 48 sati izloženosti djelovanju ICRF-a došlo je do smanjenja razine ciklina A i B1, no ne i do njihovog potpunog nestanka čak ni 72 sata nakon tretmana ICRF-om. To upućuje na izlazak samo dijela stanica iz ciklusa uslijed dugotrajnog zastoja izazvanog izlaganjem oštećenju DNA. Budući da je pritom razina ciklina A i B1 bila viša u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne, i ovdje možemo

zaključiti da je  $\Delta Np73\alpha$  doveo do ostanka većeg udjela stanica u ciklusu, odnosno u produljenom zastoju u G2/M. To je omogućilo ulazak većeg udjela stanica u ponovnu replikaciju DNA što je dovelo do porasta udjela poliploidije. Jedan od mogućih uzroka uočene pojave (endoreplikacije) je niža razina p21 kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne, osobito naglašeno 24 sata nakon izlaganja ICRF-u. Zanimljivo, istovremeno je razina ekspresije i fosforiliranosti p53 na položaju S15 bila viša kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ , što smo već primijetili u određenoj mjeri i u drugim eksperimentima (*Slika 37*).



**Slika 39: Utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na ekspresiju glavnih regulatora staničnog ciklusa i odgovora na oštećenje DNA u stanicama U2OS nakon tretmana ICRF-om.** Stanice s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolne stanice (K) izložene su djelovanju ICRF-a (IC) u koncentraciji 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sakupljene nakon 6, 24, 48 i 72 sata te je Western blotom utvrđena ekspresija  $\Delta Np73\alpha$ , pRb, Chk2, ciklina B1, ciklina A, p53, p27 i p21, kao i razina fosforiliranosti proteina pRb, Chk2 i p53. Strelice označavaju gornju proteinsku vrpcu koja odgovara fosforiliranom obliku pRb i Chk2. KN - kontrola nanošenja jednakih količina uzoraka staničnih proteina.

Da bi potvrdili rezultate protočne citometrije koji ukazuju na prisutnost poliploidnih stanica željeli smo ispitati razliku u učestalosti ulaska u replikaciju DNA između stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica tretiranih ICRF-om. U tu svrhu koristili smo ugradnju bromodeoksiuridina. Metodologija eksperimenta shematski je prikazana na slici (*Slika 40A*). Stanice smo tretirali ICRF-om tijekom 24 sata nakon nasađivanja, zatim smo dodali bromodeoksiuridin te ostavili zajedno s ICRF-om tijekom naredna 24 sata. Zatim smo stanice fiksirali, te inkubirali s primarnim protutijelom za BrdU.



**Slika 40: Analiza ulaska u replikaciju DNA stanica U2OS nakon tretmana ICRF-om. A)** Shematski prikaz tijeka eksperimenta analize ulaska u replikaciju stanica U2OS ugradnjom bromodeoksiuridina (BrdU). Stanice su 24 sata nakon nasadivanja izložene djelovanju ICRF-a u koncentraciji 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nakon 24 sata stanicama je dodan BrdU te ostavljen zajedno s ICRF-om naredna 24 sata. Zatim su stanice fiksirane te je provedena analiza ugradnje BrdU imunofluorescencijom (nakon 48 sata izloženosti djelovanju ICRF-a). **B)** Analiza ulaska u replikaciju DNA stanica U2OS ugradnjom BrdU tijekom tretmana ICRF-om. Stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolnim stanicama (K) dodan je BrdU nakon 24 sata tretmana ICRF-om te ostavljen sljedeća 24 sata zajedno s ICRF-om. Imunofluorescencijom je utvrđen ugrađeni BrdU (crveno) kao i ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  (zeleno) koristeći specifična protutijela. **C)** Ulazak u replikaciju stanica U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  ( $\Delta N$ ) i kontrolnih stanica (K) tretiranih ICRF-om. Na osi Y prikazan je udio stanica koje su u promatranom razdoblju ugradile BrdU, odnosno dale pozitivni signal nakon bojenja specifičnim protutijelom u ukupnom broju prisutnih stanica (obojenih Hoechst-om). Brojevi iznad stupaca histograma pokazuju postotak stanica s ugrađenim BrdU u promatranj populaciji.

Analizom slika dobivenih na fluorescencijskom mikroskopu (**Slika 40B**) uočili smo veći udio stanica sa ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (50,56%) sa ugrađenim BrdU u odnosu na kontrolne (33,62%) (**Slika 40C**). Usporednim bojenjem stanične DNA Hoechst-om uočili smo da je do ugradnje BrdU došlo pretežno kod stanica s povećanom jezgrom, pri čemu je kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  zabilježen veći udio takvih stanica u odnosu na kontrolne. Iz toga se može zaključiti da je kod određenog dijela stanica tijekom produljene izloženosti djelovanju ICRF-a došlo do replikacije DNA bez prethodne mitoze, a  $\Delta Np73\alpha$  je znatno pojačao učestalost te pojave, endoreplikacije.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. p73 u tumorigenezi

Od njihovog otkrića do danas prikupljen je niz dokaza o onkogenom djelovanju izoformi  $\Delta Np73$ , osobito  $\Delta Np73\alpha$ . Budući da izoforme  $\Delta Np73$  djeluju kao dominantno-negativni inhibitori proteina p53 i TAp73 divljeg tipa (Zaika i sur., 2002; Stiewe i sur., 2002a), njihov utjecaj na nastanak i razvoj tumora obično se povezuje upravo s tim svojstvom. Svoje djelovanje ostvaruju ponajprije inhibirajući niz procesa koji doprinose supresiji tumora poput diferencijacije, zastoja staničnog ciklusa, apoptoze i osjetljivosti tumora na kemoterapiju posredovanih djelovanjem p53 ili TAp73. Jedan od prvih pokazatelja koji su upućivali na moguću ulogu izoformi  $\Delta Np73$  u tumorigenezi je česta pojačana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  u nizu različitih tumora i tumorskih staničnih linija čovjeka (Zaika i sur., 2002; Concin i sur., 2004; Concin i sur., 2005). Ubrzo je pojačana ekspresija  $\Delta Np73$  povezana s lošijom prognozom i odgovorom na terapiju (povećana otpornost na kemoterapiju i zračenje) (Concin i sur., 2005; Liu i sur., 2006a).

Poremećena regulacija staničnog ciklusa i/ili puteva koji su odgovorni za izlazak iz njega uslijed genotoksičnog stresa osobina je većine tumorskih stanica te predstavlja jedan od važnih čimbenika u tumorigenezi. Zbog nepravilne aktivnosti sudionika u odgovoru na oštećenje DNA ili tumorskih supresora, kao što su p53 ili pRb, koji su presudni za zaustavljanje ciklusa u nepovoljnim uvjetima, može doći do nepravodobne proliferacije, te različitih oblika genomske nestabilnosti (Malumbres i Barbacid, 2009). Međutim, još nije potpuno razjašnjeno kako izoforme p73 utječu na te puteve.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na sudjelovanje različitih izoformi proteina p73 u procesima vezanima za održavanje genomske stabilnosti, odnosno u pojavi različitih nepravilnosti u broju pojedinih kromosoma ili količini ukupnog staničnog genoma - ploidnosti. Razvojem specifičnih TAp73-*knockout* miševa uvidjelo se da su izoforme TAp73 važne za održavanje genomske stabilnosti, te u njihovoj odsutnosti dolazi do povećane učestalosti aneuploidije, česte pojave u većini tumora (Tomasini i sur., 2008). Slično je pokazala i druga skupina istraživača koja je ustanovila da gubitak TAp73 u stanicama u kojima već nedostaje p53 dovodi do još veće genomske nestabilnosti povećavajući



učestalost aneuploidije i poliploidije (Talos i sur., 2007). Nasuprot tome, objavljeno je da ektopična ekspresija TAp73 dovodi do povećanja udjela poliploidnih stanica nakon tretmana kolcemidom. To je povezano sa sposobnošću ove izoforme da stupa u interakciju s proteinima Bub1 i Bub3, važnima u formiranju diobenog vretena (Vernole i sur., 2009).

S druge strane, jedino objavljeno istraživanje vezano uz izoforme  $\Delta Np73$  pokazalo je da ektopična ekspresija  $\Delta Np73\beta$  u staničnoj liniji karcinoma pluća ne-malih stanica čovjeka H1299 uzrokuje porast tetraploidije (Marrazzo i sur., 2009). U tom radu autori su istraživali isključivo utjecaj ekspresije  $\Delta Np73\beta$  te nije korišten nikakav dodatni tretman stanica, npr. izlaganje oštećenju DNA. Također, učinak  $\Delta Np73\beta$  nije bio jako izražen u cijeloj populaciji stanica, već u stanicama koje su se odvojile od podloge (stanična smrt). To je autore navelo na zaključak da  $\Delta Np73\beta$  omogućava stanici da zaobiđe kontrolnu točku diobenog vretena te uzrokuje pojavu aberantnih mitozna i staničnu smrt mitotskom katastrofom (Marrazzo i sur., 2009).

Unatoč postojanju niza dokaza o uključenosti izoformi  $\Delta Np73$  u signalne puteve kontrole staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA, precizniji mehanizmi slabo su istraženi. Nedavno je razvoj  $\Delta Np73$ -*knockout* miševa omogućio otkriće nove uloge izoforme  $\Delta Np73\beta$  u odgovoru stanica na oštećenje DNA (Wilhelm i sur., 2010). Nakon tretmana genotoksičnim agensima u  $\Delta Np73$ -*knockout* MEF uočena je viša razina proteina p53, fosforiliranosti p53 na položaju S18 (odgovara položaju S15 kod čovjeka) te veća učestalost apoptoze u odnosu na MEF divljeg tipa. Proširenjem istraživanja na tumorske stanične linije čovjeka, pokazano je da  $\Delta Np73\beta$  stupa u interakciju s 53BP1 te tako onemogućuje prijenos signala od mjesta oštećenja do signalnih putova odgovora na oštećenje DNA. U tom istraživanju autori su pokazali da izoforma  $\Delta Np73\alpha$  nema isto djelovanje, još jednom ukazavši na razlike u aktivnosti i ulozi pojedinih izoformi p73.

Našim istraživanjem željeli smo doprinijeti razumijevanju nekih od mehanizama putem kojih je  $\Delta Np73\alpha$  uključen u proces tumorigeneze. S tim ciljem odlučili smo pratiti utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na niz regulatora staničnog ciklusa u uvjetima genotoksičnog stresa usporedno s analizom raspodjele stanica po fazama ciklusa. Naši rezultati doprinose rasvjetljavanju mehanizama kojima ova izoforma može djelovati na kontrolu staničnog ciklusa, moguće na taj način sudjelujući u tumorigenezi.

## 5.2. $\Delta Np73\alpha$ i kontrolna točka G2/M u stanicama NHF

Prvi dio našeg istraživanja usmjerili smo na normalne stanice čovjeka NHF. Odabir stanica NHF zanimljiv je iz dva različita razloga. S jedne strane, najbolji su *in vitro* model za proučavanje regulacije staničnog ciklusa jer su u njima najvjernije očuvani signalni putevi koji u tome sudjeluju. S druge strane, normalne stanice čovjeka rijetko su korištene u istraživanju izoformi  $\Delta Np73$  (Stiewe i sur., 2003), a pogotovo se malo zna o njihovoj uključenosti u regulaciju staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA u ovim stanicama. Stoga je bilo zanimljivo istražiti može li ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  poremetiti preciznu regulaciju staničnog ciklusa u stanicama NHF nakon izlaganja različitim agensima koji oštećuju DNA.

U većem dijelu istraživanja oštećenje DNA izazvali smo  $\gamma$ -zračenjem koje u nesinkroniziranim stanicama NHF dovodi do zastoja u G1/S i G2/M. Očekivano, primijetili smo određene razlike u raspodjeli stanica ovisno o korištenoj dozi zračenja. No, zanimljivo, zračenje stanica NHF višom dozom zračenja (10 Gy) izazvalo je naglašeniji zastoj u kontrolnoj točki G2/M, dok je nakon zračenja stanica nižom dozom (5 Gy) očekivano bio izraženiji zastoj u kontrolnoj točki G1/S (**Slike 21 i 22**). Iz toga bismo mogli zaključiti da zračenje višom dozom zračenja iz određenog razloga dovodi do poremećaja kontrolne točke G1/S, ili da stanice ozračene nižom dozom učinkovitije prevladavaju zastoj u kontrolnoj točki G2/M. Nedavno su objavljeni rezultati koji govore u prilog ograničenjima kontrolne točke G1/S (Deckbar i sur., 2010). U tom radu je pokazano da nakon duljeg vremena poslije zračenja višim dozama dolazi do prevladavanja zastoja u G1/S u dijelu stanica, njihovog prolaska kroz replikaciju i zaustavljanja u G2/M. No, autori su višim dozama smatrali one iznad 2 Gy, a također udio stanica koje su uspjele prevladati G1/S unatoč zadržavanju oštećenja (vidljivo po prisutnosti kromosomskih lomova u fazi G2) sveukupno nije bio toliko velik da bi njime mogli objasniti porast stanica zaustavljenih u G2/M koji smo primijetili u našim eksperimentima.

Dok smo pri nižoj dozi zračenja (5 Gy) nakon ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  uočili određeno povećanje tetraploidnih stanica (sa sadržajem DNA 4N), pri višoj dozi došlo je do blagog porasta stanica sa sadržajem DNA > 4N (**Slika 32**). To se može objasniti smanjenjem razine p21 kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ . Da  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do smanjenja

ekspresije p21 pokazali smo pri različitim uvjetima i korištenim agensima (nakon izlaganja  $\gamma$ -zračenju, bleomicinu i ICRF-u) (**Slike 23, 26 i 27**), što upućuje na inhibiciju p53.

U normalnim stanicama čovjeka, poput u ovom radu korištenih NHF, uslijed produljenog zastoja stanica zbog oštećenja DNA dolazi do trajnog izlaska stanica iz ciklusa u fazi G1 ili G2 (senescencija) (Baus i sur., 2003). Zbog toga nakon oštećenja DNA u ovim stanicama ne dolazi do značajnijeg poremećaja genomske stabilnosti. Čak i nakon izlaganja visokoj dozi zračenja od 10 Gy primijetili smo mali udio poliploidnih stanica, kao i nakon izlaganja ICRF-u (**Slike 22 i 24**). Ektopična ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  nije uzrokovala značajnije narušavanje kontrole staničnog ciklusa nakon oštećenja. Opazili smo određeni porast udjela poliploidnih stanica nakon tretmana dozom od 10 Gy te ICRF-om (**Slike 22 i 24**). Pritom smo uočili nižu razinu ekspresije proteina p21 (**Slika 23**). p21 se pokazao ključnim čimbenikom odgovornim za zaustavljanje normalnih stanica ne samo u kontrolnoj točki G1/S (Dulić i sur., 1994), već i G2/M (Baus i sur., 2003; Lossaint i sur., 2011). Smanjenje razine p21 (**Slike 20, 23 i 26**) moguće dovodi do neučinkovitog zastoja u G2/M u manjem dijelu stanica što uzrokuje prolazak stanica u mitozu (videomikroskopija, **Slika 25**). S druge strane, niska razina p21 sprečava inaktivaciju pRb što otežava izlazak iz staničnog ciklusa i odlazak u senescenciju. U skladu s tim, nakon tretmana stanica  $\gamma$ -zračenjem i bleomicinom primijetili smo da je kod manjeg dijela stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  došlo do ugradnje BrdU, dok je kod kontrolnih stanica zastoj izazvan oštećenjem DNA bio gotovo potpun (**Slika 28**). Ovi rezultati upućuju na to da  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ipak omogućava manjem dijelu stanica u populaciji da prevladaju zastoj ciklusa izazvan  $\gamma$ -zračenjem.

Niža razina p21 dovodi do jače fosforilacije pRb što dovodi do oslobađanja dijela transkripcijskih faktora E2F i njihovog djelovanja na ekspresiju regulatora mitoze. U skladu s tim uočili smo nešto višu razinu ciklina A i B1 u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  u odnosu na kontrolne, što upućuje na češći ostanak stanica u ciklusu (**Slika 23**). Naime, nakon zastoja u G2, p21 inhibira komplekse ciklin-Cdk odgovorne za fosforilaciju pRb (Baus i sur., 2003). Održavanjem pRb u hipofosforiliranom stanju onemogućena je, između ostalog, transkripcija mitotskih regulatora što sprečava ulazak u mitozu (Flatt i sur., 2000). Tijekom produljenog zastoja u G2/M dolazi do razgradnje regulatora mitoze posredstvom prerane aktivacije kompleksa APC-CDH1 uslijed čega stanice izlaze iz ciklusa (Lee i sur., 2009; Gillis i sur., 2009; Wiebusch i Hagemeyer, 2010; Gire i Dulić, 2015; Krenning i sur., 2014).

Na temelju prethodnih rezultata te osobite važnosti kontrole ulaska stanica u mitozu, sinkronizacijom stanica pomoću HU željeli smo detaljnije ispitati uključenost  $\Delta Np73\alpha$  u regulaciju kontrolne točke G2/M. No, u promatranim uvjetima ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  nije pokazala značajniji učinak na prevladavanje ove kontrolne točke. Jedno od mogućih objašnjenja je da je korištena doza zračenja (12 Gy) ipak previsoka te izaziva preveliko oštećenje DNA da bi se moglo prevladati, čak i nakon ekspresije potencijalnog onkogeno koji pri različitim uvjetima pokazuje određeno djelovanje na kontrolu staničnog ciklusa. Također moramo spomenuti poteškoće u postizanju više razine ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  u normalnim stanicama. Zbog ograničenog broja dioba stanica prije nego uđu u replikativno starenje, ektopičnu ekspresiju  $\Delta Np73\alpha$  nismo mogli postići izolacijom stabilno transficiranih klonova, te smo stoga koristili ektopičnu ekspresiju infekcijom retrovirusom. No, postignuta razina  $\Delta Np73\alpha$  u stanicama NHF u pravilu je bila niska i vjerojatno nedostatna da poremeti aktivnost p53 i pRb (*Slike 19 i 20*).

### 5.3. $\Delta Np73\alpha$ i kontrolna točka G2/M u stanicama U2OS

Za razliku od normalnih stanica, u tumorskim staničnim linijama često su poremećeni različiti signalni putevi uključeni u stanični odgovor na oštećenje DNA, unatoč izostanku mutacija u pojedinim proteinima koji sudjeluju u tim putevima. Tako je, primjerice, u mnogim istraživanim tumorskim staničnim linijama, među ostalima i u U2OS korištenima u ovom istraživanju, koje eksprimiraju p53 divljeg tipa, signalni put ATM/p53/p21 slabo funkcionalan zbog poremećaja u aktivaciji ATM (Lossaint i sur., 2011). Pored toga, nedavno je pokazano da mutirana fosfataza Wip1 uzrokuje poremećaj uloge p53 u odgovoru na oštećenje DNA (Kleiblova i sur., 2013). Stoga u ovim stanicama nije moguće aktivirati kontrolnu točku G1/S koja ovisi ponajprije o ovom putu, dok je aktivacija kontrolne točke G2/M ovisna o aktivnosti Chk1. Zbog slabo aktivnog signalnog puta ATM/p53/p21 u stanicama U2OS, glavnu ulogu u izazivanju zastoja u G2 nakon oštećenja DNA ima Chk1 (Syljuåsen i sur., 2006; Lossaint i sur., 2011).

U našim eksperimentima pokazali smo porast učestalosti poliploidije u stanicama U2OS pod utjecajem  $\Delta Np73\alpha$  nakon  $\gamma$ -zračenja dozom od 10 Gy (*Slika 33*), te osobito nakon izloženosti djelovanju ICRF-a (*Slika 38*). Pritom je razina p21 bila niža u stanicama s

ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ , što bi moglo biti odgovorno za navedeni porast poliploidije (**Slike 34 i 39**). Kod produljene inkubacije nakon djelovanja zračenja i ICRF-a uočili smo pojačanu fosforiliranost pRb u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ . To je u skladu s nižom razinom p21 koja omogućava veću aktivnost kompleksa ciklina i Cdk odgovornih za fosforilaciju pRb. Također, kod duljih vremenskih razdoblja nakon djelovanja oštećenja, ekspresija ciklina A i B1 bila je viša u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (**Slike 34 i 39**), što upućuje na ostanak većeg dijela stanica u ciklusu. To smo i potvrdili imunofluorescencijom analizirajući ekspresiju ciklina A nakon duljeg vremenskog razdoblja (96 sata) od  $\gamma$ -zračenja (**Slike 35**). U ozračenim stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  utvrdili smo veći udio stanica koje ekspimiraju ciklin A u odnosu na kontrolne stanice.

Analizom ulaska u replikaciju pomoću ugradnje BrdU tijekom tretmana ICRF-om pokazali smo da dio stanica koje su prethodno bile zaustavljene u G2/M ipak ulazi u novi ciklus replikacije. Time smo potvrdili da je uočena poliploidija najvećim dijelom rezultat endoreplikacije (uočili smo i stanice s dvije jezgre koje nastaju zbog nemogućnosti razdvajanja nakon mitoze uslijed djelovanja ICRF-a). Kod stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  udio stanica koje su ugradile BrdU bio je znatno povišen, što govori u prilog tvrdnji da  $\Delta Np73\alpha$  uzrokuje ostanak većeg broja stanica u ciklusu i dovodi do endoreplikacije.

Zanimljivo, usprkos slaboj indukciji p21, u stanicama izloženim genotoksičnim agensima ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovela je do porasta ekspresije proteina p53 te njegove fosforiliranosti na položaju S15 (p<sup>S15</sup>-p53; **Slike 34 i 39**). Također smo uočili porast fosforiliranosti Chk2 u stanicama U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  nakon izlaganja  $\gamma$ -zračenju, bleomicinu i ICRF-u (**Slike 36, 37 i 39**). Ovi rezultati, naizgled proturječni onkogenoj ulozi  $\Delta Np73\alpha$ , možda se mogu u određenoj mjeri povezati s činjenicom da je pojačana aktiviranost određenih regulatora odgovora na oštećenje DNA pronađena u uzorcima tumora ranog stadija tumorigeničnosti (Bartkova i sur., 2005; Gorgoulis i sur., 2005). Signalni putevi odgovora na oštećenje DNA predstavljaju moguću protutumorsku barijeru tijekom rane tumorigeneze. Tako je imunohistokemijskom analizom pronađena pojačana aktivacija/fosforiliranost ATM, Chk2, p53 i H2AX u uzorcima ranijih stadija tumora mokraćnog mjehura čovjeka, dok je u tumorskim uzorcima kasnijeg stadija njihova fosforiliranost bila smanjena (Bartkova i sur., 2005).

## 5.4. Mehanizam djelovanja $\Delta Np73\alpha$

Kao što smo već spomenuli, najznačajnije poznato djelovanje  $\Delta Np73\alpha$  u tumorigenezi je ono dominantno–negativnog inhibitora p53 (Zaika i sur., 2002; Stiewe i sur., 2002a). Metodom koimunoprecipitacije otkrivena je interakcija proteina  $\Delta Np73\alpha$  i p53, no nije uočena stabilizacija p53 djelovanjem  $\Delta Np73\alpha$  (Slade i sur., 2004). p53 i TAp73 vežu se na elemente promotora P2 čime potiču ekspresiju  $\Delta Np73\alpha$ , tvoreći omču negativne povratne sprege. U skladu s djelovanjem na p53,  $\Delta Np73\alpha$  sprečava porast razine p21 u različitim staničnim modelima i uvjetima. To smo ovim radom potvrdili i mi, budući da je kod stanica NHF i U2OS ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  uzrokovala smanjenje razine p21 pri različitim tretmanima (*Sluke 20, 23, 26, 27, 34 i 36*). Iznenadujuće, u našim pokusima ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi sistematski i do porasta razine P<sup>S15</sup>-p53 (*Sluke 20, 23, 36, 38 i 39*). Fosforiliranost na položaju S15 jedna je od modifikacija p53 važna u njegovoj aktivaciji te se koristi kao jedan od biljega oštećenja DNA (Banin i sur., 1998; Shieh i sur., 1997). Iz naših rezultata možemo zaključiti da je p53 bio manje učinkovit u aktivaciji transkripcije p21 u prisutnosti  $\Delta Np73\alpha$ , što je u skladu s djelovanjem  $\Delta Np73\alpha$  na aktivnost p53.  $\Delta Np73\alpha$  može inhibirati djelovanje p53 na transkripciju na dva moguća načina: kompeticijom u vezanju na promotore ciljnih gena ili stvaranjem neaktivnih heterokompleksa s proteinom p53 (Moll i Slade, 2004). U našim eksperimentima smo uz porast razine fosforiliranog p53, često uočili i porast razine ukupnog p53. Moguće je da do povećanja razine p53 ipak dolazi zbog stabilizacije vezanjem s  $\Delta Np73\alpha$  pri određenim uvjetima, no takav p53 očitno ne pokazuje aktivnost prema promotoru *p21*, unatoč fosforilaciji na S15. Možemo zaključiti da je za fosforilaciju p53 u ovom slučaju najvjerojatnije odgovorna neka druga kinaza, a ne ATM (moguće ATR). No, postoji mogućnost da takav p53 ima ulogu u nekim drugim signalnim putovima koji ne uključuju p21.

Porast razine ukupnog p53 kao i njegove fosforiliranosti pod utjecajem  $\Delta Np73\alpha$  dosada nije uočen u nijednom drugom istraživanju. Jedino poznato istraživanje vezano uz izoforme  $\Delta Np73$  tijekom kojeg je praćena ekspresija i fosforilacija p53 je ono u kojem su Wilhelm i suradnici otkrili ulogu  $\Delta Np73\beta$  u inhibiciji prijenosa signala tijekom odgovora na oštećenje DNA (Wilhelm i sur., 2010). U tom radu autori su uočili da nakon izlaganja

genotoksičnim agensima u  $\Delta$ Np73-*knockout* MEF dolazi do nakupljanja ukupnog i fosforiliranog p53 (P<sup>S18</sup> koji odgovara P<sup>S15</sup> kod čovjeka) u odnosu na MEF divljeg tipa. No, važno je napomenuti da je u tim stanicama ukinuta ekspresija svih izoformi  $\Delta$ Np73 te nije bilo moguće precizno pripisati to djelovanje isključivo  $\Delta$ Np73 $\alpha$  ili  $\beta$ . Budući da je za aktivaciju ATM i p53 važna njihova interakcija s 53BP1 (Zgheib i sur., 2005) autori su nadalje ispitali mogućnost interakcije između 53BP1 te  $\Delta$ Np73 $\alpha$ , odnosno  $\Delta$ Np73 $\beta$ . U stanicama U2OS su pokazali da ektopično ekspimiran  $\Delta$ Np73 $\beta$  stupa u interakciju s 53BP1, dok  $\Delta$ Np73 $\alpha$  nije pokazao isto svojstvo. Također, ektopična ekspresija  $\Delta$ Np73 $\beta$  u stanicama U2OS dovela je do smanjenja fosforilacije ATM i razine ukupnog p53 (nisu analizirali i P<sup>S15</sup>) nakon  $\gamma$ -zračenja (Wilhelm i sur., 2010).

U odnosu na opisano istraživanje, naši rezultati predstavljaju još jedan dokaz o različitom, čak i suprotnom djelovanju pojedinih izoformi proteina p73. Iako se naizgled radi o srodnim izoformama ponajprije zbog neposjedovanja transaktivacijskog područja na N-kraju, i neka ranija istraživanja ukazala su na bitne razlike u aktivnosti i djelovanju između  $\Delta$ Np73 $\alpha$  i  $\beta$  u različitim staničnim modelima i uvjetima (Liu i sur., 2004a). Da bi se razjasnio utjecaj koji pojedine izoforme  $\Delta$ Np73 imaju na fosforilaciju p53 i njegovu aktivnost u različitim procesima trebalo bi u budućnosti provesti detaljnija istraživanja pri različitim uvjetima i staničnim modelima.

Smanjenje razine p21 u stanicama s ektopičnom ekspresijom  $\Delta$ Np73 $\alpha$  može biti i rezultat djelovanja  $\Delta$ Np73 $\alpha$  neovisno o utjecaju na p53. Naime, Kartasheva i suradnici su luciferaznim testom pokazali da u stanicama H1299 u kojima je delecijom sprječena ekspresija p53, ektopična ekspresija  $\Delta$ Np73 $\alpha$  dovodi do smanjenja aktivnosti promotora gena *p21*. No, u tim stanicama prisutna je ekspresija TAp73 $\beta$  (izoforma p73 koja pokazuje najjače aktivacijsko djelovanje na niz ciljnih gena proteina p53, između ostaloga i na *p21*), te bi se uočeno smanjenje transkripcije moglo pripisati inhibiciji aktivnosti TAp73 $\beta$  (Kartasheva i sur., 2003).

Uz inhibiciju p53 i ostalih tumor supresorskih članova obitelji p53, izoforme  $\Delta$ Np73 djeluju i kao inhibitori drugog važnog tumorskog supresora, pRb, uzrokujući njegovu pojačanu fosforilaciju (Stiewe i sur., 2003). Na taj način omogućavaju ekspresiju niza gena uključenih u progresiju staničnog ciklusa. To je već neko vrijeme poznato i smatra se da djeluje preko pojačane aktivnosti kompleksa ciklin D-Cdk4/6 i ciklin E-Cdk2 (Tannapfel i sur.,

2008), no precizniji mehanizam nikad nije istražen. Spomenuta istraživanja provedena su analizirajući utjecaj ektopične ekspresije  $\Delta Np73$  na proliferaciju stanica NHF uzgajanih bez seruma na prijelazu iz stanja mirovanja u fazu G1 (Stiewe i sur., 2003), odnosno na karcinogenezu jetre u miševima *in vivo* te pritom stanice nisu bile izložene nikakvom drugom tretmanu (Tannapfel i sur., 2008). Uočena uloga  $\Delta Np73\alpha$  neovisna je o prisutnosti p53, stoga predstavlja dodatni mehanizam kojim  $\Delta Np73\alpha$  ostvaruje svoje potencijalno onkogeno djelovanje.

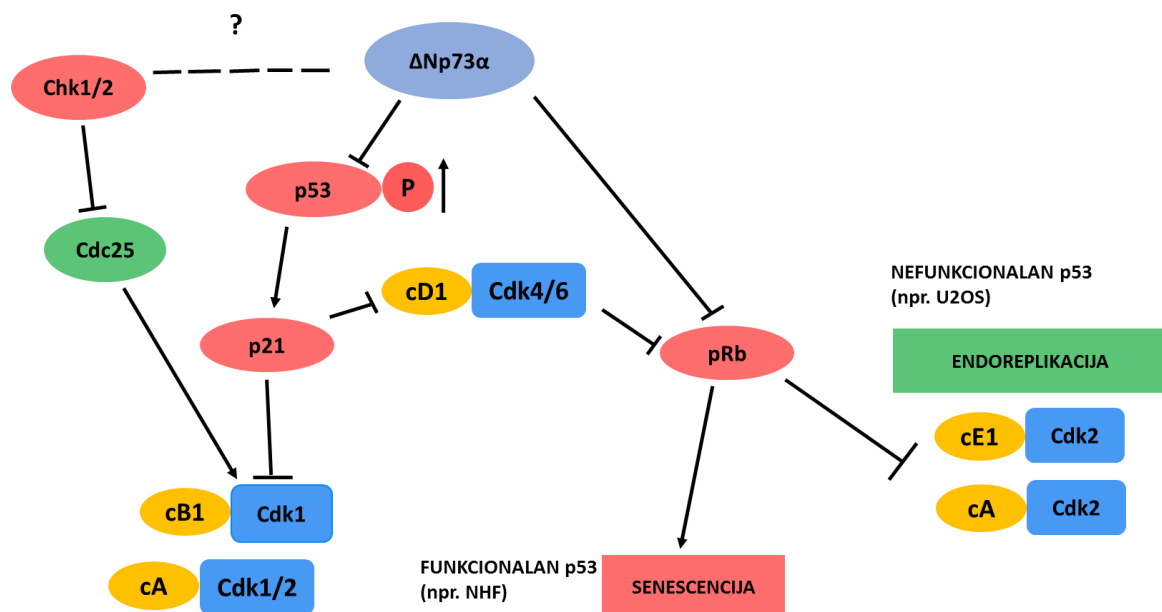
U određenim uvjetima i mi smo uočili pojačanu fosforiliranost pRb u stanicama NHF i U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ . Tako je primjerice pRb jače fosforiliran u stanicama U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  izloženim dugotrajnijem tretmanu ICRF-om u odnosu na U2OS-K pri istim uvjetima (**Slika 39**). Pojačanu fosforilaciju pRb očito je omogućila snižena razina p21 (vidljivo osobito nakon 24 sata izlaganja ICRF-u) nedovoljna za učinkovitu inhibiciju aktivnosti kompleksa ciklin-Cdk odgovornih za fosforilaciju pRb. Inaktivacija pRb omogućava transkripciju niza gena, između ostalog i onih uključenih u replikaciju što dozvoljava povećanu učestalost poliploidije u ovim stanicama (**Slika 38A i C**). Pojačanu fosforilaciju pRb uočili smo i kod duljih vremenskih razdoblja nakon  $\gamma$ -zračenja, osobito dozom od 10 Gy kod U2OS s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  (**Slika 34**), što je također bilo praćeno porastom tetraploidnih i poliploidnih stanica u odnosu na kontrolne stanice (**Slika 33**).

Budući da smo najjači učinak  $\Delta Np73\alpha$  pokazali u stanicama U2OS u kojima značajnu ulogu u kontrolnoj točki G2/M ima Chk1 (Syljuasen i sur., 2006, Lossaint i sur., 2011), bilo bi zanimljivo detaljnije ispitati utječe li  $\Delta Np73\alpha$  na njezinu aktivnost (fosforilaciju) tijekom različitih tretmana. Luciferaznim testom u stanicama KOV-3 pokazano je da  $\Delta Np73\alpha$  uzrokuje porast transkripcije *chk1* (Carrassa i sur., 2003). No, budući da se ovdje radi o ektopičnom sustavu, trebalo bi ispitati djeluje li slično endogeni  $\Delta Np73\alpha$  na endogeni *chk1*. Također, u slučaju Chk1, sama razina proteina nije pokazatelj njegove aktivnosti, nego je nužno ispitati i fosforilaciju. Informacije o mogućem utjecaju  $\Delta Np73\alpha$  na djelovanje Chk1 mogle bi doprinijeti rasvjetljavanju mehanizma kojim  $\Delta Np73\alpha$  djeluje na kontrolu staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA.

Na temelju naših dosadašnjih rezultata prikazanih u ovom radu nameće se zaključak da do uočenog utjecaja  $\Delta Np73\alpha$  na kontrolu staničnog ciklusa nakon genotoksičnog stresa



dolazi ponajprije zbog smanjenja razine p21 (**Slika 41**). Niža ekspresija p21 omogućava višu aktivnost kompleksa ciklina-Cdk što dovodi do izraženije fosforilacije i inaktivacije pRb, i što onemogućava izlazak stanica iz ciklusa u senescenciju. Uslijed produljenog zastoja u G2/M kod većeg broja stanica (osobito naglašeno kod U2OS) došlo je do porasta poliploidije za koju smo u slučaju tretmana ICRF-om pokazali da je rezultat ponovne replikacije. Budući da smo nakon tretmana NHF ICRF-om uočili ulazak jednog dijela stanica u mitozu kod ektopične ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  nameće se zaključak da niža razina p21 omogućava i nešto veću aktivnost regulatora mitoze, kao što su kompleksi ciklin B1-Cdk1 i ciklin A-Cdk1.



**Slika 41: Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na odgovor na oštećenje DNA.**  $\Delta Np73\alpha$  djeluje kao dominantno-negativni inhibitor p53 te dovodi do slabije indukcije p21 nakon oštećenja DNA. Time je smanjena inhibicija različitih kompleksa ciklin-Cdk koji sudjeluju u izazivanju i održavanju zastoja u kontrolnoj točki G2/M. Slabija inhibicija kompleksa ciklin B1-Cdk1 i ciklin A-Cdk1/2 može dovesti do prolaska određenog dijela stanica u mitozu. S druge strane, slabija inhibicija kompleksa ciklin D1-Cdk4/6 dovodi do jače fosforilacije (inaktivacije) pRb. To omogućava ekspresiju ciklina E1 i A koji sudjeluju u novom ciklusu replikacije DNA (endoreplikacija).

Iako neki autori navode utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na porast proliferacije stanica (Stiewe i sur., 2003), većina istraživanja ne podržava tu ulogu (Marabese i sur., 2005, Marrazzo i sur., 2006). Istraživanja na nekoliko različitih tumorskih staničnih linija čovjeka s različitim statusom p53 pokazala su da ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  ne dovodi do agresivnijeg tumorskog fenotipa, bržeg rasta broja stanica ni slabijeg odgovora na određene tretmane

koji oštećuju DNA (Marabese i sur., 2005, Marrazzo i sur., 2006). U stanicama HCT116 koje eksprimiraju p53 divljeg tipa pojačana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  nije uzrokovala promjene u krivuljama rasta klonova *in vitro* niti *in vivo* nakon injektiranja u miševе (Marabese i sur., 2005). Ista skupina znanstvenika proširila je istraživanje na stanice koje ne eksprimiraju p53. Stanice H1299 i HCT116 (klon 379.2, p53-/-) s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  imale su slično vrijeme udvostručenja populacije stanica kao i netretirane kontrolne stanice. Također, krivulje preživljenja klonova bile su slične nakon tretmana različitim genotoksičnim agensima (Marrazzo i sur., 2006). Ta su istraživanja donekle dovela u pitanje onkogeno djelovanje  $\Delta Np73\alpha$ , no nisu isključila mogućnost nekog drugog načina na koji bi mogao sudjelovati u tumorigenezi.

Ni mi u svojim istraživanjima nismo primijetili značajniji utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na staničnu proliferaciju, uspoređujući npr. učestalost ugradnje BrdU (**Slika 28 i 29**) i učestalost mitozā (**Slika 25**) između netretiranih stanica s ektopičnom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  i kontrolnih stanica NHF. Ono što smo uočili je ovisnost ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  o izlasku stanica iz ciklusa u stanje mirovanja (G0) što smo promatrali uzgajanjem stanica u uvjetima kontaktne inhibicije i bez dodatka seruma (**Slika 20**).

Lefkimmiatis i suradnici (2009) već su ranije pokazali da p73 i p63 utječu na ekspresiju gena potrebnih za odvijanje staničnog ciklusa u normalnim fiziološkim uvjetima. Naime, u tumorskoj staničnoj liniji MCF-7 pokazano je da se razina ekspresije endogene izoforme  $\Delta Np73\alpha$  mijenja tijekom staničnog ciklusa. I oni su u svom istraživanju izložili stanice izgladnjivanju (uzgoj u tekućoj hranjivoj podlozi s niskom koncentracijom seruma) tijekom 48 sati što je bilo praćeno smanjenjem razine  $\Delta Np73\alpha$ . Dodatkom seruma stanice su stimulirane na ulazak u ciklus što je dovelo do porasta razine  $\Delta Np73\alpha$  već na prijelazu iz G1/S, s najvišom razinom u fazi S. Utišavanje ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  korištenjem specifične siRNA, dovelo je do smanjenja stanične proliferacije mjereno ugradnjom bromodeoksiuridina i testom MTT. Nasuprot tome, ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  u istim stanicama dovela je do porasta proliferacije mjereno istim metodama. Također,  $\Delta Np73\alpha$  se pokazao aktivnim u poticanju ekspresije niza gena uključenih u progresiju staničnog ciklusa (ADA, FASN, CCND3, POLD2, CDC25C, CDC2) mjereno luciferaznim testom.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da protein  $\Delta Np73\alpha$  sudjeluje u kontroli staničnog ciklusa, osobito na prijelazu G2/M. No, njegovo djelovanje ne omogućava brzi

odgovor, odnosno ne doprinosi prevladavanju zastoja u kontrolnoj točki G2/M u kratkom vremenskom razdoblju nakon izloženosti oštećenju DNA. S druge strane,  $\Delta Np73\alpha$  se pokazao učinkovitim (više kod tumorskih stanica koje ekspimiraju p53) u sprečavanju izlaska stanica iz ciklusa čime dolazi do porasta tetraploidije i poliploidije uzrokujući nestabilnost genoma, te na taj način vjerojatno doprinosi tumorigenezi.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Western blot analizom nismo uočili endogenu ekspresiju izoforme  $\Delta Np73\alpha$  u stanicama U2OS, NHF i NHF-E6.
2. Tijekom tretmana ICRF-om ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  omogućila je manjem dijelu stanica NHF ulazak u mitozu, povezano sa smanjenom ekspresijom p21, što ukazuje na ulogu  $\Delta Np73\alpha$  u kontrolnoj točki G2/M.
3. Ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  ne sprečava zastoj u kontrolnoj točki G2/M u stanicama NHF, NHF-E6 i U2OS.
4. Nakon zračenja stanica NHF nižom dozom (5 Gy) češći je zastoj u G1/S, dok je nakon zračenja višom dozom (10 Gy) naglašeniji zastoj u G2/M pri čemu ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do (manjeg) porasta poliploidije.
5. Ektopična ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovodi do porasta tetraploidije i poliploidije u stanicama U2OS nakon  $\gamma$ -zračenja i izloženosti ICRF-u, praćeno smanjenjem razine p21, te porastom razine ciklina B1, ciklina A, i fosforilacije pRb, Chk2 i p53.

## 7. LITERATURA

- Abraham RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**: 2177–2196.
- Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y (1999). Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* **399**: 809–813.
- Ahn J, Urist M, Prives C (2003). Questioning the role of checkpoint kinase 2 in the p53 DNA damage response. *J Biol Chem* **278**: 20480–20489.
- Allocati N, Di Ilio C, De Laurenzi V (2012). p53/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Exp Cell Res* **318**: 1285–1290.
- Atherton-Fessler S, Liu F, Gabrielli B, Lee MS, Peng CY, Piwnicka-Worms H (1994). Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Mol Biol Cell* **5**: 989–1001.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**: 232–236.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**: 1674–1677.
- Bartek J, Lukas J (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 238–245.
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**: 864–870.
- Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, Dulić V (2003). Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J* **22**: 3992–4002.
- Bell SP, Stillman B (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**: 128–134.
- Bénard J, Douc-Rasy S, Ahomadegbe J-C (2003). TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* **21**: 182–91.
- Blandino G, Levine AJ, Oren M (1999). Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* **18**: 477–485.

- Bálint E, Phillips AC, Kozlov S, Stewart CL, Vousden KH (2002). Induction of p57(KIP2) expression by p73beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3529–3534.
- Boris-Lawrie KA, Temin HM (1993). Recent advances in retrovirus vector technology. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 102–109.
- Braden WA, Lenihan JM, Lan Z, Luce KS, Zagorski W, Bosco E, i sur. (2006). Distinct action of the retinoblastoma pathway on the DNA replication machinery defines specific roles for cyclin-dependent kinase complexes in prereplication complex assembly and S-phase progression. *Mol Cell Biol* **26**: 7667–7681.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, i sur. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**: 913–917.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, i sur. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**: 1497–1501.
- Burkhart DL, Sage J (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* **8**: 671–682.
- Byun TS, Pacek M, Yee M, Walter JC, Cimprich KA (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Cancer* **19**: 1040–1052.
- Carrassa L, Brogginini M, Vikhanskaya F, Damia G (2003). Characterization of the 5'flanking region of the human Chk1 gene: identification of E2F1 functional sites. *Cell Cycle* **2**: 604–609.
- Casciano I, Mazzocco K, Boni L, Pagnan G, Banelli B, Allemanni G, i sur. (2002). Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* **9**: 246–251.
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**: 616–620.
- Charrier-Savournin FB, Château M-T, Gire V, Sedivy J, Piette J, Dulić V (2004). p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol Biol Cell* **15**: 3965–3976.
- Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* **14**: 278–288.
- Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ (1996). mdm-2 Inhibits the G 1 Arrest and Apoptosis Functions of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell Biol* **16**: 2445–2452.

- Chen S, De Vries MA, Bell SP (2007). Orc6 is required for dynamic recruitment of Cdt1 during repeated Mcm2 – 7 loading. *Genes Dev* **21**: 2897–2907.
- Chen Y, Poon RYC (2008). The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Front Biosci* **13**: 5016–29.
- Chen Z, Xiao Z, Gu WZ, Xue J, Bui MH, Kovar P, i sur. (2006). Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. *Int J Cancer* **119**: 2784–2794.
- Concin N, Becker K, Slade N, Erster S, Mueller-Holzner E, Ulmer H, i sur. (2004). Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* **64**: 2449–2460.
- Concin N, Hofstetter G, Berger A, Gehmacher A, Reimer D, Watrowski R, i sur. (2005). Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: Evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin Cancer Res* **11**: 8372–8383.
- Corn PG, Kuerbitz SJ, Van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, i sur. (1999). Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* **59**: 3352–3356.
- Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, i sur. (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* **9**: 175–186.
- Costanzo A, Pediconi N, Narcisi A, Guerrieri F, Belloni L, Fausti F, i sur. (2014). TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS Lett* **588**: 2590–2599.
- Costanzo V, Robertson K, Ying CY, Kim E, Avvedimento E, Gottesman M, i sur. (2000). Reconstitution of an ATM-Dependent Checkpoint that Inhibits Chromosomal DNA Replication following DNA Damage. *Mol Cell* **6**: 649–659.
- Davoli T, Denchi EL, de Lange T (2010). Persistent Telomere Damage Induces Bypass of Mitosis and Tetraploidy. *Cell* **141**: 81–93.
- Davoli T, de Lange T (2011). The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 585–610.
- De Boer L, Oakes V, Beamish H, Giles N, Stevens F, Somodevilla-Torres M, i sur. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* **27**: 4261–4268.
- Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**: 271–283.

- Deckbar D, Stiff T, Koch B, Reis C, Löbrich M, Jeggo PA. (2010). The limitations of the G1-S checkpoint. *Cancer Res* **70**: 4412–4421.
- De Cola A, Bongiorno-Borbone L, Bianchi E, Barcaroli D, Carletti E, Knight RA, i sur. (2011). FLASH is essential during early embryogenesis and cooperates with p73 to regulate histone gene transcription. *Oncogene* **31**: 573-582.
- 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.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, i sur. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**: 215–221.
- Downes CS, Clarke DJ, Mullinger AM, Giménez-Ablán JF, Creighton AM, Johnson RJ (1994). A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature* **372**: 467–470.
- Dulić V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, i sur. (1994). p53-Dependent Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase Activities in Human Fibroblasts during Radiation-Induced G1 Arrest. *Cell* **76**: 1013–1023.
- Dulić V, Stein GH, Far DF, Reed SI (1998). Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* **18**: 546–557.
- Duursma A, Agami R (2005). p53-Dependent Regulation of Cdc6 Protein Stability Controls Cellular Proliferation p53-Dependent Regulation of Cdc6 Protein Stability Controls Cellular Proliferation †. *Mol Cell Biol* **25**: 6937–6947.
- Dyson N (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**: 2245–2262.
- el-Deiry WS (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **8**: 345–357.
- Enomoto M, Goto H, Tomoro Y, Kasahara K, Tsujimura K, Kiyono T, i sur. (2009). Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *J Biol Chem* **284**: 34223–34230.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**: 389–396.
- Falck J, Lukas C, Protopopova M, Lukas J, Selivanova G, Bartek J (2001). Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* **20**: 5503–5510.



- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, i sur. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**: 917–921.
- Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietsenpol JA (2000). p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol* **20**: 4210-4223.
- Floyd S, Pines J, Lindon C (2008). APC/CCdh1 Targets Aurora Kinase to Control Reorganization of the Mitotic Spindle at Anaphase. *Curr Biol* **18**: 1649–1658.
- Fontemaggi G, Gurtner A, Strano S, Higashi Y, Sacchi A, Piaggio G, i sur. (2001). The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* **21**: 8461–8470.
- Francis LI, Randell JCW, Takara TJ, Uchima L, Bell SP (2009). Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2 – 7 helicase for Cdc7 – Dbf4 phosphorylation. *Genes Dev* **23**: 643–654.
- Fung TK, Poon RYC (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* **16**: 335–342.
- Furuno N, Den Elzen N, Pines J (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* **147**: 295–306.
- 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.
- Gaiddon C, Lokshin M, Gross I, Levasseur D, Taya Y, Loeffler JP, i sur. (2003). Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at Threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73. *J Biol Chem* **278**: 27421–27431.
- Galaktionov K, Chen X, Beach D (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**: 511–517.
- García-Higuera I, Manchado E, Dubus P, Cañamero M, Méndez J, Moreno S, i sur. (2008). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol* **10**: 802–811.
- Gatenby RA (2009). A change of strategy in the war on cancer. *Nature* **459**: 508–509.
- Giacinti C, Giordano A (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**: 5220–5227.
- Gillis LD, Leidal AM, Hill R, Lee PWK (2009). p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. *Cell Cycle* **8**: 253–256.
- Gire V, Dulić V (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* **14**: 297–304.

- Goldstone S, Pavey S, Forrest A, Sinnamon J, Gabrielli B (2001). Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene* **20**: 921–932.
- Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Levrero M, i sur. (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399**: 806–809.
- Gonzalez S, Prives C, Cordon-Cardo C (2003). p73 $\alpha$  Regulation by Chk1 in Response to DNA Damage. *Mol Cell Biol* **23**: 8161–8171.
- Gorgoulis VG, Vassiliou L-VF, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, i sur. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**: 907–913.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**: 296-299.
- Hansen DV, Loktev A V, Ban KH, Jackson PK (2004). Plk1 Regulates Activation of the Anaphase Promoting Complex by Phosphorylating and Triggering SCF $\beta$ TrCP - dependent Destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* **15**: 5623–5634.
- Harms K, Nozell S, Chen X (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 822–842.
- Harper JW, Elledge SJ (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**: 739–745.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **8**: 193–204.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham a, Ruland J, Yoshida H, i sur. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**: 1824–1827.
- Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**: 5834–5847.
- Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG (2003). Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* **3**: 403–410.
- Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T, Ikawa S (2002). Possible oncogenic potential of  $\Delta$ Np73: A newly identified isoform of human p73. *Cancer Res* **62**: 636–641.
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* **5**: 143–148.

- Jackson SP, Jackson SP, Bartek J, Bartek J (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**: 1071–1078.
- Jallepalli PV, Lengauer C, Vogelstein B, Bunz F (2003). The Chk2 tumor suppressor is not required for p53 responses in human cancer cells. *J Biol Chem* **278**: 20475–20479.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, i sur. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**: 313–320.
- Jin J, Ang XL, Ye X, Livingstone M, Harper JW (2008). Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J Biol Chem* **283**: 19322–19328.
- Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, i sur. (2014). Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell* **55**: 73–84.
- Jørgensen PM, Brundell E, Starborg M, Höög C (1998). A subunit of the anaphase-promoting complex is a centromere-associated protein in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **18**: 468–476.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, i sur. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**: 809–819.
- Kartasheva NN, Lenz-Bauer C, Hartmann O, Schäfer H, Eilers M, Dobbelstein M (2003). DeltaNp73 can modulate the expression of various genes in a p53-independent fashion. *Oncogene* **22**: 8246-8254.
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14973–14977.
- Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Ševčík J, Pecháčková S, Pohlreich P, i sur. (2013). Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *J Cell Biol* **201**: 511–521.
- Knudson AG (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 820–823.
- Krämer A, Mailand N, Lukas C, Syljuåsen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, i sur. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* **6**: 884–891.
- Krenning L, Feringa FM, Shaltiel IA, van den Berg J, Medema RH (2014). Transient Activation of p53 in G2 Phase Is Sufficient to Induce Senescence. *Mol Cell* **55**: 59–72.

- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* **24**: 2463–2479.
- Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG (2006). TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex. *Cell* **124**: 943–955.
- Lane DP, Crawford L V (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261–263.
- Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* **22**: 966–980.
- Larner JM, Lee H, Hamlin JL (1997). S phase damage sensing checkpoints in mammalian cells. *Cancer Surv* **29**: 25–45.
- Lavin MF, Schroeder AL (1988). Damage-resistant DNA synthesis in eukaryotes. *Mutat Res* **193**: 193–206.
- Lee J, Kim JA, Barbier V, Fotedar A, Fotedar R (2009). DNA damage triggers p21WAF1-dependent Emi1 down-regulation that maintains G2 arrest. *Mol Biol Cell* **20**: 1891–1902.
- Lefkimmatis K, Caratozzolo MF, Merlo P, D’Erchia AM, Navarro B, Levrero M, i sur. (2009). P73 and P63 Sustain Cellular Growth By Transcriptional Activation of Cell Cycle Progression Genes. *Cancer Res* **69**: 8563–8571.
- Leone G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* **387**: 422–426.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323–331.
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* **113**: 1661–1670.
- Li R, Sutphin PD, Schwartz D, Matas D, Almog N, Wolkowicz R, i sur. (1998). Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene* **16**: 3269–3277.
- Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnicka-Worms H (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* **17**: 571–583.
- Liu G, Nozell S, Xiao H, Chen X (2004a). DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol* **24**: 487–501.

- Liu H, Dibling B, Spike B, Dirlam A, Macleod K (2004b). New roles for the RB tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 55–64.
- Liu P, Barkley LR, Day T, Bi X, Slater DM, Alexandrow MG, i sur. (2006a). The Chk1-mediated S-phase checkpoint targets initiation factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent mechanism. *J Biol Chem* **281**: 30631–44.
- Liu P, Slater DM, Lenburg M, Nevis K, Cook JG, Vaziri C (2009). Replication licensing promotes cyclin D1 expression and G1 progression in untransformed human cells. *Cell Cycle* **8**: 125–136.
- Liu SS, Chan KYK, Cheung ANY, Liao XY, Leung TW, Ngan HYS (2006b). Expression of  $\Delta$ Np73 and TAp73 $\alpha$  independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**: 3922–3927.
- Löbrich M, Jeggo PA (2007). The impact of a negligent G/M checkpoint on genomic instability and Cancer Induction. *Nature Rev Cancer* **7**: 861–870.
- Lossaint G, Besnard E, Fisher D, Piette J, Dulić V (2011). Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. *Oncogene* **30**: 4261–4274.
- Lukas C, Sørensen CS, Kramer E, Santoni-Rugiu E, Lindeneg C, Peters JM, i sur. (1999). Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**: 815–818.
- Maas AM, Bretz AC, Mack E, Stiewe T (2013). Targeting p73 in cancer. *Cancer Lett* **332**: 229–236.
- Machida YJ, Teer JK, Dutta A (2005). Acute reduction of an origin recognition complex (ORC) subunit in human cells reveals a requirement of ORC for Cdk2 activation. *J Biol Chem* **280**: 27624–27630.
- Mailand N, Diffley JFX (2005). CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* **122**: 915–926.
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuåsen RG, Welcker M, Bartek J, i sur. (2000). Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science* **288**: 1425–1430.
- Malumbres M, Barbacid M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* **9**: 153–166.
- Marabese M, Marchini S, Sabatino MA, Polato F, Vikhanskaya F, Marrazzo E, i sur. (2005). Effects of inducible overexpression of DNP73 $\alpha$  on cancer cell growth and response to treatment in vitro and in vivo. *Cell Death Differ* **12**: 805–814.

- Marabese M, Vikhanskaya F, Rainelli C, Sakai T, Broggin M (2003). DNA damage induces transcriptional activation of p73 by removing C-EBP $\alpha$  repression on E2F1. *Nucleic Acids Res* **31**: 6624–6632.
- Margolis SS, Perry JA, Forester CM, Nutt LK, Guo Y, Jardim MJ, i sur. (2006). Role for the PP2A/B56 $\delta$  Phosphatase in Regulating 14-3-3 Release from Cdc25 to Control Mitosis. *Cell* **127**: 759–773.
- Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JDR, Jackson PK (2003). Prophase destruction of Emi1 by the SCF <sup>$\beta$ TrCP/Slimb</sup> ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* **4**: 813–826.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O’Nions J, Tidy JA, i sur. (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* **25**: 47–54.
- Marrazzo E, Marchini S, Previdi S, Broggin M (2006). Questioning the oncogenic role of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  in different cell lines expressing p53 or not. *Cancer Biol Ther* **5**: 794–803.
- Marrazzo E, Marchini S, Tavecchio M, Alberio T, Previdi S, Erba E, i sur. (2009). The expression of the  $\Delta$ Np73 $\beta$  isoform of p73 leads to tetraploidy. *Eur J Cancer* **45**: 443–453.
- Martin SA, Lord CJ, Ashworth A (2008). DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 80–86.
- Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem* **79**: 89–130.
- Masai H, Taniyama C, Ogino K, Matsui E, Kakusho N, Matsumoto S, i sur. (2006). Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin. *J Biol Chem* **281**: 39249–39261.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**: 1893–1897.
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10389–10394.
- Matsuyama M, Goto H, Kasahara K, Kawakami Y, Nakanishi M, Kiyono T, i sur. (2011). Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J Cell Sci* **124**: 2113–2119.
- McGarry TJ, Kirschner MW (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**: 1043–1053.

- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**: 708–713.
- Mitra J, Enders GH (2004). Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* **23**: 3361–3367.
- Moll UM, Slade N (2004). p63 and p73 : Roles in Development and Tumor Formation. *Mol Cancer Res* **2**: 371–387.
- Morgan DO (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131–134.
- Morgan DO (2007). The Cell Cycle: Principles of Control. London, New Science Press.
- Moshe Y, Boulaire J, Pagano M, Hershko A (2004). Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7937–7942.
- Nevis KR, Cordeiro-Stone M, Cook JG (2009). Origin licensing and p53 status regulate Cdk2 activity during G1. *Cell Cycle* **8**: 1952–1963.
- Nigg EA (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 21–32.
- Nishitani H, Taraviras S, Lygerou Z, Nishimoto T (2001). The Human Licensing Factor for DNA Replication Cdt1 Accumulates in G 1 and Is Destabilized after Initiation of S-phase. *J Biol Chem* **276**: 44905–44911.
- Ogg S, Gabrielli B, Piwnica-Worms H (1994). Purification of a serine kinase that associates with and phosphorylates human Cdc25C on serine 216. *J Biol Chem* **269**: 30461–30469.
- Ozaki T, Okoshi R, Ono S, Kubo N, Nakagawara A (2009). Deregulated expression of E2F1 promotes proteolytic degradation of tumor suppressor p73 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **387**: 143–148.
- Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldin V, Ansorge W, Bartek J, et al. (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* **121**: 101–111.
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* **11**: 961–971.
- Parker LL, Atherton-Fessler S, Piwnica-Worms H (1992). P107Wee1 Is a Dual-Specificity Kinase That Phosphorylates P34Cdc2 on Tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2917–2921.

- Peng CY, Graves PR, Ogg S, Thoma RS, Byrnes MJ, Wu Z, i sur. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* **9**: 197–208.
- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**: 1501–1505.
- Perry JA, Kornbluth S (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Div* **2**: 12.
- Petrenko O, Zaika A, Moll UM (2003). deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol* **23**: 5540–5555.
- Picksley SM, Lane DP (1993). The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?. *Bioessays* **5**: 689-690.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* **289**: 304–306.
- Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB (2007). p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell* **11**: 175–189.
- Ren J, Datta R, Shioya H, Li Y, Oki E, Biedermann V, i sur. (2002). p73beta is regulated by protein kinase Cdelta catalytic fragment generated in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem* **277**: 33758–33765.
- Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO (1992). Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 2824–2828.
- Rotman G, Shiloh Y (1999). ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* **18**: 6135–6144.
- Roy R, Adamczewski JP, Seroz T, Vermeulen W, Tassan JP, Schaeffer L, i sur. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* **79**: 1093–1101.
- Sadasivam S, DeCaprio JA (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* **13**: 585–95.
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, i sur. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**: 1497–1501.



- Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J, Lukas J (2000). Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol* **20**: 3497–3509.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**: 495–505.
- Scian MJ, Carchman EH, Mohanraj L, Stagliano KER, Anderson M a E, Deb D, i sur. (2008). Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene* **27**: 2583–2593.
- Scoumanne A, Harms KL, Chen X (2005). Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol Ther* **4**: 1178–1185.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501–1512.
- Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate, p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**: 289–300.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**: 325–334.
- Shiloh Y (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**: 155–168.
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, i sur. (2008). Chk1 Is a Histone H3 Threonine 11 Kinase that Regulates DNA Damage-Induced Transcriptional Repression. *Cell* **132**: 221–232.
- Sigl R, Wandke C, Rauch V, Kirk J, Hunt T, Geley S (2009). Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *J Cell Sci* **122**: 4208–4217.
- Sivakumar S, Gorbsky GJ (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 82–94.
- Slade N, Horvat A (2011). Targeting p73--a potential approach in cancer treatment. *Curr Pharm Des* **17**: 591–602.
- Slade N, Zaika AI, Erster S, Moll UM (2004). DeltaNp73 stabilises TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. *Cell Death Differ* **11**: 357–360.

- Smits VAJ, Klomp maker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkelä TP, Medema RH (2000). p21 Inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* **275**: 30638–30643.
- Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**: 599-602.
- Souza CP De, Ellem KA, Gabrielli BG (2000). Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp Cell Res* **257**: 11–21.
- Speck C, Chen Z, Li H, Stillman B (2005). ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 965–971.
- Sterner JM, Dew-Knight S, Musahl C, Kornbluth S, Horowitz JM (1998). Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol* **18**: 2748–2757.
- Stiewe T, Pützer BM (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* **26**: 464–469.
- Stiewe T, Stanelle J, Theseling CC, Pollmeier B, Beitzinger M, Pützer BM (2003). Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. *J Biol Chem* **278**: 14230–14236.
- Stiewe T, Theseling CC, Pützer BM (2002a). Transactivation-deficient  $\Delta$ TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding. Implications for tumorigenesis. *J Biol Chem* **277**: 14177–14185.
- Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Pützer BM (2002b). Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res* **62**: 3598–3602.
- Strausfeld U, Labbé JC, Fesquet D, Cavadore JC, Picard A, Sadhu K, i sur. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* **351**: 242–245.
- Sun X-F (2002). p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **8**: 165–170.
- Syljuåsen RG, Jensen S, Bartek J, Lukas J (2006). Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res* **66**: 10253–10257.
- Syljuåsen RG, Sørensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, i sur. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* **25**: 3553–62.

- Takeda DY, Parvin JD, Dutta A, Chem TJB (2005). Degradation of Cdt1 during S Phase Is Skp2-independent and Is Required for Efficient Progression of Mammalian Cells through S Phase. *J Biol Chem* **280**: 23416–23423.
- Talos F, Nemajerova A, Flores ER, Petrenko O, Moll UM (2007). p73 Suppresses Polyploidy and Aneuploidy in the Absence of Functional p53. *Mol Cell* **27**: 647–659.
- Tannapfel A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, i sur. (1999). Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1154–1158.
- Tannapfel A, John K, Miše N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, i sur. (2008). Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis* **29**: 211–218.
- Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, i sur. (2008). TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* **22**: 2677–2691.
- Torres JZ, Ban KH, Jackson PK (2010). A specific form of phospho protein phosphatase 2 regulates anaphase-promoting complex/cyclosome association with spindle poles. *Mol Biol Cell* **21**: 897–904.
- Tsai KKC, Yuan ZM (2003). c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. *Cancer Res* **63**: 3418–3424.
- Urist M, Tanaka T, Poyurovsky MV, Prives C (2004). p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* **18**: 3041–3054.
- Vernole P, Neale MH, Barcaroli D, Munarriz E, Knight RA, Tomasini R, i sur. (2009). TAp73 $\alpha$  binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell Cycle* **8**: 421–429.
- Van Vugt MATM, Bràs A, Medema RH (2005). Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt. *Cancer Res* **65**: 7037–7040.
- Wang X, Zeng L, Wang J, Chau JFL, Lai KP, Jia D, i sur. (2011). A positive role for c-Abl in Atm and Atr activation in DNA damage response. *Cell Death Differ* **18**: 5–15.
- Wiebusch L, Hagemeier C (2010). p53- and p21-dependent premature APC/C-Cdh1 activation in G2 is part of the long-term response to genotoxic stress. *Oncogene* **29**: 3477–3489.
- Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, i sur. (2010). Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev* **24**: 549–560.

- Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A (2000). Inhibition of Eukaryotic DNA Replication by Geminin Binding to Cdt1. *Science* **290**: 2309–2313.
- Wu L, Levine AJ (1997). Differential Regulation of the p21 / WAF-1 and mdm2 Genes after High-Dose UV Irradiation : p53-Dependent and p53-Independent Regulation of the mdm2 Gene. *Molecular Medicine* **3**: 441-451.
- Yabuuchi H, Yamada Y, Uchida T, Sunathvanichkul T, Nakagawa T, Masukata H (2006). Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *EMBO J* **25**: 4663–4674.
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F (2002). On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* **18**: 90–95.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, i sur. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**: 305–316.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, i sur. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**: 99–103.
- Yao G, Lee TJ, Mori S, Nevins JR, You L (2008). A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. *Nat Cell Biol* **10**: 476–482.
- Ye C, Zhang X, Wan J, Chang L, Hu W, Bing Z, i sur. (2013). Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2 arrested cells into G1 phase. *Cell Cycle* **12**: 1424–32.
- You Z, Masai H (2008). Cdt1 forms a complex with the minichromosome maintenance protein (MCM) and activates its helicase activity. *J Biol Chem* **283**: 24469–24477.
- Yuan ZM, Huang Y, Ishiko T, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D (1997). Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1437–1440.
- Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, i sur. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**: 814–817.
- Zaika A, Irwin M, Sansome C, Moll UM (2001). Oncogenes Induce and Activate Endogenous p73 Protein. *J Biol Chem* **276**: 11310–11316.
- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, i sur. (2002). DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* **196**: 765–780.

- Zgheib O, Huyen Y, DiTullio RA, Snyder A, Venere M, Stavridi ES, et al. (2005). ATM signaling and 53BP1. *Radiother Oncol* **76**: 119–22.
- Zhang W, Liu HT (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**: 9–18.
- Zhou BB, Elledge SJ (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433–439.
- Zorić A, Horvat A, Slade N (2013). Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* **34**: 522–529.
- Zou L (2007). Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response. *Genes Dev* **21**: 879–85.
- Zou L, Liu D, Elledge SJ (2003). Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13827–32.

## 8. SAŽETAK

$\Delta Np73\alpha$  je onkogeno izoforma proteina p73, čija je ekspresija često pojačana u tumorima i tumorskim staničnim linijama, i povezana je s povećanom otpornosti na kemoterapiju i zračenje te lošijim ishodom bolesti. U ovom radu željeli smo ispitati utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na kontrolu staničnog ciklusa u normalnim i tumorskim stanicama čovjeka nakon genotoksičnog stresa izazvanog različitim dozama  $\gamma$ -zračenja, radiomimetikom bleomicinom i ICRF-om (izaziva specifično zastoje u G2/M). Pojačanu ekspresiju  $\Delta Np73\alpha$  u normalnim fibroblastima čovjeka (NHF), fibroblastima koji ekspimiraju protein E6 virusa HPV-16 (NHF-E6) i staničnoj liniji osteosarkoma U2OS postigli smo retrovirusnom infekcijom. Promatrali smo utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  na raspodjelu stanica po fazama ciklusa (protočnom citometrijom), ekspresiju različitih regulatora staničnog ciklusa nakon oštećenja DNA (metodom Western blot i imunofluorescencijom) i staničnu proliferaciju (videomikroskopijom). Nakon izlaganja stanica U2OS visokoj dozi  $\gamma$ -zračenja, te osobito ICRF-u, došlo je do značajnog povećanja udjela poliploidnih stanica kod stanica s pojačanom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  u odnosu na kontrolne. Istodobno, pojačana ekspresija  $\Delta Np73\alpha$  dovela je do niže ekspresije p21 i p27, te više ekspresije ciklina A, ciklina B1, p53, kao i fosforiliranih oblika p53, Chk2 i pRb. Smanjenje razine p21, uz povećanje fosforiliranosti p53 i Chk2, te smanjenje fosforiliranosti Chk1 primijetili smo i nakon tretmana bleomicinom stanica U2OS s pojačanom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$ . Utjecaj  $\Delta Np73\alpha$  u stanicama NHF bio je umjereniji. Ipak, nakon djelovanja  $\gamma$ -zračenja, i slabije nakon izloženosti ICRF-u, u stanicama NHF s pojačanom ekspresijom  $\Delta Np73\alpha$  primijetili smo određeni porast udjela poliploidije. Pritom smo uočili nižu ekspresiju p21 i p27, višu ekspresiju p53, povećani udio fosforiliranih oblika p53 i pRb. Nakon  $\gamma$ -zračenja stanica NHF i NHF-E6 prethodno sinkroniziranih u G1/S djelovanjem hidroksiureje nismo uočili značajniji utjecaj pojačane ekspresije  $\Delta Np73\alpha$  na prevladavanje kontrolne točke G2/M, na temelju čega možemo zaključiti da  $\Delta Np73\alpha$  ne sudjeluje u brzom odgovoru stanica na oštećenje.

Dobiveni rezultati ukazuju na ulogu  $\Delta Np73\alpha$  u narušavanju kontrolne točke G2/M nakon oštećenja DNA u stanicama U2OS, dok je ovaj učinak bio nešto manji u normalnim stanicama, uzrokujući genomsku nestabilnost. Ovi rezultati daju uvid u nove moguće mehanizme kojima ovaj protein ostvaruje svoje onkogeno djelovanje.

## 9. SUMMARY

$\Delta$ Np73 $\alpha$  represents oncogenic -p73 protein isoform, which is often overexpressed in tumors and tumor cell lines, correlating with increased chemo- and radioresistance and worse disease outcome. The aim of our work is to investigate the effect of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  on cell cycle control in normal and tumor human cells after genotoxic stress caused by  $\gamma$ -irradiation, radimimetic bleomycin and ICRF-193 (that specifically causes G2/M arrest).

We obtained ectopic overexpression of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  in normal human fibroblasts (NHF), fibroblasts expressing E6 HPV-16 oncoprotein (NHF-E6) and U2OS osteosarcoma cell line by retroviral infection. Next we analysed the influence of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  on cell cycle distribution (by flow cytometry), expression of several cell cycle and DNA damage response regulators (by Western blot analysis and immunofluorescence) and cell proliferation (by time-lapse videomicroscopy). After exposing U2OS cells to higher doses of  $\gamma$ -irradiation, and especially to ICRF-193, we observed significant increase in polyploidy in cells overexpressing  $\Delta$ Np73 $\alpha$  compared to control cells. Also,  $\Delta$ Np73 $\alpha$  overexpression led to lower p21 and p27, and higher cyclin A, cyclin B1, and p53 expression and higher phosphorylation of p53, Chk2 and pRb. Lower p21 expression accompanied by increased p53 and Chk2, and decreased Chk1 phosphorylation was observed also upon bleomycin treatment of U2OS cells overexpressing  $\Delta$ Np73 $\alpha$ . The effect of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  in NHF cells was more modest. Still, after  $\gamma$ -irradiation irradiation, and less upon ICRF exposure, NHF with  $\Delta$ Np73 $\alpha$  overexpression have shown increased the ratio of polyploid cells. It was accompanied by lower p21 and p27, higher p53 expression and p53 and pRb phosphorylation. After  $\gamma$ -irradiation of NHF and NHF-E6 cells previously synchronized in G1/S by hydroxyurea, no significant effect of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  overexpression on overcoming of G2/M checkpoint was observed, concluding that  $\Delta$ Np73 $\alpha$  is not part of fast cell response to DNA damage.

Our results indicate the role of  $\Delta$ Np73 $\alpha$  in abrogation of G2/M DNA damage checkpoint in U2OS cells, and to a less extent, in normal cells, causing genomic instability. These results give us new insight in novel possible mechanisms by which this protein exerts its oncogenic function.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. lipnja 1983.g. u Sinju. Osnovnu školu sam završila u Kaštel Lukšiću, a jezičnu gimnaziju u Splitu, obje s izvrsnim uspjehom sudjelujući na natjecanjima znanja iz različitih predmeta. 2001.g. upisala sam studij biologije – smjer molekularna biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2005.g. bila sam na dvomjesečnoj studentskoj praksi na Fakultetu prirodnih znanosti i farmacije na Sveučilištu u Navarri u Pamploni (Španjolska). Diplomirala sam 24. svibnja 2007.g. s izvrsnim uspjehom (prosjeck ocjena 4,84), a diplomski rad pod nazivom „Razlike u stabilnosti izoformi tumor supresorskog proteina p53“ izradila sam u Laboratoriju za molekularnu onkologiju Instituta „Ruđer Bošković“ pod mentorstvom dr. sc. Nede Slade. Iste godine zaposlena sam kao znanstveni novak (asistent) u Laboratoriju za molekularnu onkologiju Instituta Ruđer Bošković na projektu MZOŠ-a „Uloga mreže proteina p53/p73 u sarkomima mekih tkiva“ pod vodstvom dr. sc. Nede Slade. 2008.g. upisala sam poslijediplomski doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu u Osijeku. Tijekom izrade doktorskog rada bila sam na nekoliko stručnih usavršavanja u inozemstvu (2007., 2008. i 2009.g.) na Institutu za molekularnu genetiku u Montpellieru (Francuska) u okviru francusko-hrvatskog bilateralnog programa „Cogito“ pod vodstvom dr. sc. Vjekoslava Dulića, komentora ovog doktorskog rada. 2008.g. godine dobila sam stipendiju Vlade Francuske Republike za tromjesečno stručno usavršavanje koje sam također provela u Montpellieru. Sudjelovala sam kao asistent u nastavi na dvama kolegijima na poslijediplomskom studiju Molekularne bioznanosti Sveučilišta u Osijeku. Sudjelovala sam na četiri međunarodne konferencije prezentacijom postera, te na dvije domaće konferencije (kratkim usmenim izlaganjem i prezentacijom postera-nagrada EACR-a za najbolji poster 2014.g.). Za sudjelovanje na konferencijama dobila sam nekoliko stipendija organizatora (npr. EACR-a 2015.g.). Član sam Hrvatskog društva za istraživanje raka, Europskog društva za istraživanje raka te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Objavila sam pet znanstvenih radova. Govorim engleski, španjolski i talijanski jezik. Udata sam i majka dvoje djece.



**Publikacije:**

Zorić A, **Horvat A**, Slade N (2013). Differential effects of diverse p53 isoforms on TAp73 transcriptional activity and apoptosis. *Carcinogenesis* **34**: 522-529.

Zorić A, **Horvat A**, Balića M, Slade N (2012). The Arg72Pro Polymorphism of TP53 in Croatian Population. *Croatica Chemica Acta* **85**: 239-243.

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

Zorić A, **Horvat A**, Slade N (2010). Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina Fluminensis* **46**: 135-143.

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