Utjecaj izoformi gena p73 na metiliranja DNA u stanicama raka

Tučkar, Neven

Doctoral thesis / Disertacija

2012

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:650490

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Neven Tučkar

UTJECAJ IZOFORMI GENA p73 NA METILIRANJA DNA U STANICAMA RAKA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Neven Tučkar

THE ROLE OF p73 ISOFORMS ON DNA METHYLATION IN CANCER CELLS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

Ovaj je doktorski rad izrađen u laboratoriju za molekularnu onkologiju Zavoda za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Nede Slade, više znanstvene suradnice, te u suradnji sa Genome Sequencing and Microarray Core, Department of Environmental Health, University of Cincinnati Medical Center, Cincinnati, OH, SAD, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

... mom dragom tati

Malo je što znamo,
neizmjerno što ne znamo.

Josip Ruđer Bošković

Ovom prilikom želim zahvaliti svima koji su pomogli da ovaj rad uspije.

- na prvome mjestu dragoj mentorici dr. sci. **Nedi Slade** na njenom vremenu, strpljivosti, susretljivosti i sposobnosti da svoje znanje prenese drugima. Nije gubila vjeru niti žalila truda da jednog liječnika uputi u tajne genetike. Hvala na tome, vrijedilo je.

- mojem dragom prijatelju, prof.dr.sci.**Mariu Medvedoviću**, bez čijih ideja i nesebične pomoći ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana. Uz njegovu pomoć svaki problem ima tako jednostavno rješenje! Mario, hvala Ti!

- dragoj dr.sci. **Arijani Zorić**, koja je poput dobrog duha uvijek bila tu

- dr.sci. **Maji Herak Bosnar** za susretljivost i svaku pomoć kada je trebalo

- osoblju Laboratorija za molekularnu onkologiju Instituta Ruđer Bošković

- naravno, najviše zahvaljujem svojim najmilijima- mami, mojoj dragoj supruzi Dubravki, Dominiku i Marti …

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

UTJECAJ IZOFORMI GENA p73 NA METILIRANJA DNA U STANICAMA RAKA

NEVEN TUČKAR

KBC „Sestre milosrdnice“
Klinika za ženske bolesti i porodništvo
Vinogradska cesta 29, Zagreb, Hrvatska

Uloga gena p73 u tumorigenezi nije u potpunosti razjašnjena. Korištenjem promotora P1 nastaju izoforme sa cjelovitim transaktivacijskim područjem (TAp73), odnosno korištenjem promotora P2 izoforme bez te regije (ΔNp73). Najčešća promjena u tumorima je povećana ekspresija izoforme ΔNp73, koja djeluje kao transdominantni inhibitor TAp73 i p53. Metiliranost DNA je oblik reverzibilne epigenetičke regulacije, kojim se nakon replikacije dodaju metilne skupine na citozinske ostatke DNA, mijenjajući aktivnost staničnih gena. Hipermetiliranost otoka CpG u promotorskim regijama pojedinih gena inhibira transkripciju utišavajući gene. Koristeći inducibilni sustav *tet-on* ispitali smo utjecaj pojačane ekspresije TAp73α i ΔNp73α na globalnu metiliranost DNA, no nismo pronašli statistički značajnu promjenu metiliranosti uzoraka s aktiviranim izoformama p73 u odnosu na njihove kontrole. Rezultate smo usporedili s rezultatima genske ekspresije nakon aktivacije ΔNp73α i TAp73α iz literature. Za gene koji pokazuju pojačanu ekspresiju našli smo, premda statistički ne značajno, smanjenje metiliranosti promotorskih CpG otoka, što potvrđuje činjenicu da metiliranje može utjecati na regulaciju aktivnosti gena.

(75 stranica, 11 slika, 13 tablica, 108 literaturnih navoda, jezik izvornika-hrvatski)

Ključne riječi: TP73, izoforme p73, TAp73α, ΔNp73α, metiliranje

Mentor: dr. sc. Neda Slade, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. KristianVlahoviček, PMF, Sveučilište u Zagrebu
Dr. sc. Neda Slade, viša znan suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Doc. dr. sc. Damir Eljuga, KBC „Sestre milosrdnice“, Zagreb

SUMMARY

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

THE ROLE OF p73 ISOFORMS ON DNA METHYLATION IN CANCER CELLS

NEVEN TUČKAR

University Hospital „Sisters of Mercy“
Department of Gynecology and Obstetrics
Vinogradska cesta 29, Zagreb, Hrvatska

The role of p73 in tumorigenesis is not fully understood. Using P1 promoter transactivating (TAp73) isoforms are generated and P2 promoter the isoforms without this region (ΔNp73). The most common change in tumors is increased expression of ΔNp73, which acts as transdominant inhibitor of TAp73 and p53. DNA methylation is a form of epigenetic regulation, which adds methyl groups to cytosine residues, regulating gene activity. Hypermethylation of CpG islands in promoter regions inhibits transcription of genes silencing its expression. Using inducible *tet-on* system, we examined the impact of increased expression of TAp73α and ΔNp73α on global DNA methylation. However statistically significant change was not found upon induced expression of p73 isoforms. The results were compared with gene expression data obtained after induction of TAp73α or ΔNp73α from literature. For genes with increased expression we found, although not statistically significant, reduction of methylated CpG sites in promoter regions, which confirms the fact that methylation could affect the regulation of gene activity.

(75 pages, 11 figures, 13 tables, 108 references, original in Croatian)

Key words: TP73, p73 isoforms, TAp73α, ΔNp73α, methylation

Supervisor: Neda Slade, PhD, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Reviewers**:** Prof. Kristian Vlahoviček, PhD, Faculty of Science, University of Zagreb
Neda Slade, PhD, senior research associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb
Assoc. prof. Damir Eljuga, MD, PhD, University Hospital „Sisters of Mercy“, Zagreb

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. LITERATURNI PREGLED 3

2.1 Molekularna osnova tumora- onkogeni i tumor supresorski geni 4

2.2 Obitelj gena *TP53* 5

2.2.1 Struktura proteina p53 i njegovih srodnika 6

2.3 Gen *TP73*- onkogen ili tumor supresorski gen 8

2.3.1 Uloga gena *TP73* u tumorigenezi 11

2.3.2 Uloga gena *TP73* u razvoju i diferencijaciji 12

2.4 Epigenetička zbivanja 13

2.4.1 Epigenetički mehanizmi 14

2.4.2 Utjecaj metilranja DNA na ekspresiju gena i tumorigenezu 15

2.4.3 Metode otkrivanja metilirane DNA 17

2.5 Epigenetika i liječenje raka 21

3. MATERIJALI I METODE 22

3.1 Uzgoj stanica 22

3.2 Indukcija stanica 22

3.3 Izolacija proteina iz stanica 24

3.4 Određivanje koncentracije proteina metodom BCA 24

3.5 Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida 25

3.6 Prijenos proteina s poliakrilnog gela na membranu nitroceluloze 26

3.7 Analiza proteina metodom western-blota 27

3.8 Izdvajanje DNA iz stanica 28

3.9 Određivanje koncentracije DNA 29

3.10 Elektroforeza u gelu agaroze 29

3.11 Kvantitativna analiza metiliranosti DNA upotrebom *Illumina HumanMethylation450 BeadChip* 30

3.12 Određivanje metiliranosti uzoraka DNA 30

3.13 Statistička analiza 30

4. REZULTATI 32

4.1 Potvrda prisutnosti induciranih proteina TAp73α i ΔNp73α u stanicama SaOS2 Tet-ON 32

4.2 Analiza globalne metiliranosti DNA stanica SaOS2 ovisno o ekspresiji pojedinih izoformi p*73* (TAp73α i ΔNp73α) 33

4.3 Usporedba dobivenih rezultata metiliranosti genoma s rezultatima genske ekspresije dobivenih tehnikom mikročipova 44

5. RASPRAVA 56

6. ZAKLJUČCI 63

7. LITERATURA 64

8. ŽIVOTOPIS 75

1. UVOD

Tumor supresorski gen *TP53* ima ključnu ulogu u tumorigenezi. Otkrivena su dva srodnika gena *TP53* – *TP63* i *TP73*. Sva tri gena reguliraju stanični ciklus i apoptozu uzrokovanu oštećenjem DNA. Iako su vrlo slični, strukturalno i funkcionalno, među njima postoje i iznenađujuće razlike. Gen *TP73* rijetko je mutiran ali često pojačano eksprimiran u tumorima čovjeka. Međutim, isti gen kodira za transaktivirajuće proteine (TAp73) kao i izoforme proteina bez transaktivirajuće regije (nazvane ΔNp73) s potencijalnim onkogenim djelovanjem. TAp73 u tumorima je često inhibiran dominantno-negativnom izoformom ΔNp73, kao i mutiranim oblikom proteina p53.

Metilacija DNA je dinamičan, reverzibilan način epigenetičke regulacije kojim se nakon replikacije dodaju metilne skupine na citozinske ostatke u DNA (najčešće u slijed CpG) te se tako može mijenjati funkcionalnost brojnih gena u stanici. Promjene obrazaca metilacije DNA uobičajene su u stanicama raka. Metiliranu DNA prepoznaju transkripcijski proteini koji tada ne vrše svoju ulogu. Tako hipermetilacija otoka CpG unutar promotorske regije pojedinih gena inhibira transkripciju, doprinoseći utišavanju ključnih tumor supresorskih gena, npr. *P16INK4a*, *PRb*, E-kadherin i BRCA-1. Istovremeno s hipermetilacijom otoka CpG u stanicama raka dolazi do globalne hipometilacije genoma.

Za divlji tip p53 poznato je da sprečava globalnu metilaciju, posebice tumor supresorskih gena. Međutim, još nije razjašnjeno kako p73 utječe na metiliranje DNA. Određivanje mjesta metiliranja DNA moglo bi biti obećavajuće za rano otkrivanje i liječenje tumora. Naime, integrirani pristup otkrivanja epigenomskih promjena i njihov odnos s ekspresijskim profilom i funkcijom gena neophodan je za ishod liječenja.

Cilj našeg istraživanja bio je spoznati kako izoforme gena *TP73*- TAp73α i ΔNp73α utječu na obrazac metilacije DNA, te povezati dobivene rezultate s objavljenim rezultatima ekspresijske mikročip analize dobivene nakon aktivacije *TP73*.

Očekujemo da će naše istraživanje dovesti do novih spoznaja o utjecaju pojačane ekspresije TAp73, odnosno ΔNp73 na ukupnu metiliranost genoma, te će doprinijeti rasvjetljavanju funkcija i međusobnih odnosa izoformi proteina p73. Očekujemo da ćemo steći globalni pogled na epigenetičke promjene nastale pod utjecajem pojačane ekspresije izoformi p73 koje mogu mijenjati ponašanje stanice.

Za istaživanje smo koristili inducibilnu staničnu liniju SaOS-2 tet-ON TAp73α, odnosno SaOS-2 tet-ON ΔNp73α (stanice osteosarkoma čovjeka stabilno transfecirane genom za TAp73α, odnosno ΔNp73α pod kontrolom tetraciklinskog promotora).

Stanice smo inducirali dodatkom antibiotika doksiciklina (tetraciklin), što je dovelo do pojačane ekspresije određene izoforme gena *p73*. Iz induciranih stanica izdvojili smo DNA i proteine. Razinu ekspresije proteina provjerili smo Western blot analizom.

Izdvojenu genomsku DNA analizirali smo upotrebom metode Illumina 450 DNA BeadArray, koja određuje metilacijski status 480 000 otoka CpG. Dobivene rezultate usporedili smo međusobno, te sa rezultatima genske ekspresije dobivene tehnikom mikročipova (Kartasheva i sur. 2003; Koeppel i sur. 2011).

2. LITERATURNI PREGLED

Istraživanje promjene genske strukture odnosno funkcije gena predstavlja temelj za bolje razumijevanje nastanka i razvoja zloćudnih bolesti. U staničnoj obrani od zloćudne preobrazbe jednu od najvažnijih uloga imaju tumor supresorski geni. Njihov gubitak ili inaktivacija rezultira zloćudnom preobrazbom stanice. Međutim, novijim istraživanjima spoznalo se da podjela na onkogene i tumor supresorske gene nije usko specifična kako se do sada smatralo – naime, isti gen može djelovati kao onkogen ili tumor supresorski gen, ovisno o staničnome tipu. Jedan od najviše istraživanih tumor supresorskih gena je gen *TP53*, koji snažno zaustavlja stanični ciklus te potiče apoptozu. Otkriveni su i njegovi srodnici, geni *TP63* i *TP73*, koji s njime dijele strukturnu i funkcionalnu sličnost, ali i neke značajne razlike. Gen *TP73* ima nekoliko izoformi koje pokazuju različitu transkripcijsku aktivnost.

Osim promjene strukture gena uzrokovane mutacijama, aktivnosti gena reguliraju se i epigenetičkim promjenama, koje ne zadiru u promjenu slijeda DNA. Epigenetika je znanost o funkciji genoma, a ima važnu ulogu u raznolikosti bioloških procesa, kao što su embrionalni razvoj, biologija raka, imunološki odgovor organizma, te mnogi drugi. Epigenetičke promjene uključuju metiliranje, post-translacijske promjene histona, djelovanje male interferirajuće molekule RNA, te također post-translacijske promjene ne-histonskih proteina koje reguliraju stabilnost, lokalizaciju i enzimatske aktivnosti proteina uključenih u različite procese unutar stanica. Metiliranje je epigenetički mehanizam u kojem dolazi do vezivanja metilne skupine na dijelove DNA, čime im se mijenja funkcija. Većina tumor supresorskih gena procesom metiliranja se utišava.

Metilacija gena *TP73* pronađena je u određenim tipovima raka, iz čega je jasno da njegovu ekspresiju dijelom kontroliraju epigenetički događaji. Međutim, utjecaj ekspresije izoformi gena *TP73* na epigenetička zbivanja u genomu nije do kraja razjašnjen, stoga se često susreće pitanje: da li je *TP73* - onkogen ili tumor supresorski gen?

2.1 Molekularna osnova tumora- onkogeni i tumor supresorski geni

Osnovna osobina svake stanice je stroga kontrola rasta, diobe i smrti. Izuzetak su tumorske stanice koje gube kontrolu rasta. Metabolizam svake stanice određen je aktivnošću njenih gena. Stoga i nenormalno ponašanje tumorskih stanica predstavlja posljedicu kvalitativnih ili kvantitativnih promjena njenih gena (Jones i Laird, 1999). Jedna od temeljnih karakteristika tumorske stanice je neograničeni rast koji započinje tzv. „imortalizacijom" stanice, sposobnošću da se nekontrolirano dijeli. U tom trenutku stanica još nema zloćudne karakteristike. Međutim, kada stanica postane neovisna o faktorima rasta koji kontroliraju rast normalnih stanica, te potrebi usidrenja u međustanični prostor svoje okoline, postaje sve agresivnija i stječe sposobnost urastanja u okolna i udaljena tkiva (Alberts i sur, 1994). Cilj proučavanja molekularne osnove raka je odrediti gen, odnosno skupinu gena koja sudjeluje u nastanku zloćudne preobrazbe. Temeljni mehanizam nekontroliranog rasta stanice je u poremećenoj funkciji gena koji potiču rast ili blokadi negativnih metaboličkih procesa (Labar, 2001). Regulatorni geni mogu se podijeliti na gene koji potiču diobu stanica, te one koji ju koče.

Prvu skupinu čine protoonkogeni, koji su sastavni dio genoma svake eukariotske stanice. U normalnim stanicama njihova ekspresija je strogo kontrolirana i ima važnu ulogu u evoluciji, diferencijaciji i rastu. Međutim, njihovom mutacijom ili nekontroliranom ekspresijom nastaju onkogeni, koji dovode do proliferacije stanica i nastanka tumora. Izolirani iz zloćudno promijenjenih stanica, oni mogu transfekcijom DNA prenijeti transformirajuće osobine (Sorić, 1996).

Drugu skupinu čine tumor supresorski geni, skupina staničnih gena koji sprečavaju neprikladnu ili prekomjernu staničnu proliferaciju. Oni kodiraju proteine koji inhibiraju stanični ciklus i sudjeluju u popravku oštećenja DNA. Ti su geni nužni za normalno funkcioniranje stanice, a njihov gubitak uzrokuje nastanak tumora. Najčešće se inaktiviraju mutacijama, a za nastanak tumora potreban je gubitak oba alela, dakle mutacije su recesivne (Sorić, 1996).

Najznačajniji tumor supresorski protein je p53, koji je mutiran u više od 50% tumora. p53 se aktivira različitim vrstama stresa kao što su oštećenje DNA, deregulacija onkogena ili hipoksija. Aktivirani protein p53 potiče apoptozu, zastoj staničnog ciklusa i starenje te tako sprečava nastanak tumora.

Gubitkom tumor supresorske aktivnosti, mutirani proteini p53 dobivaju onkogeni potencijal što rezultira nekontroliranim rastom stanica tumora (Moll i Slade, 2004).

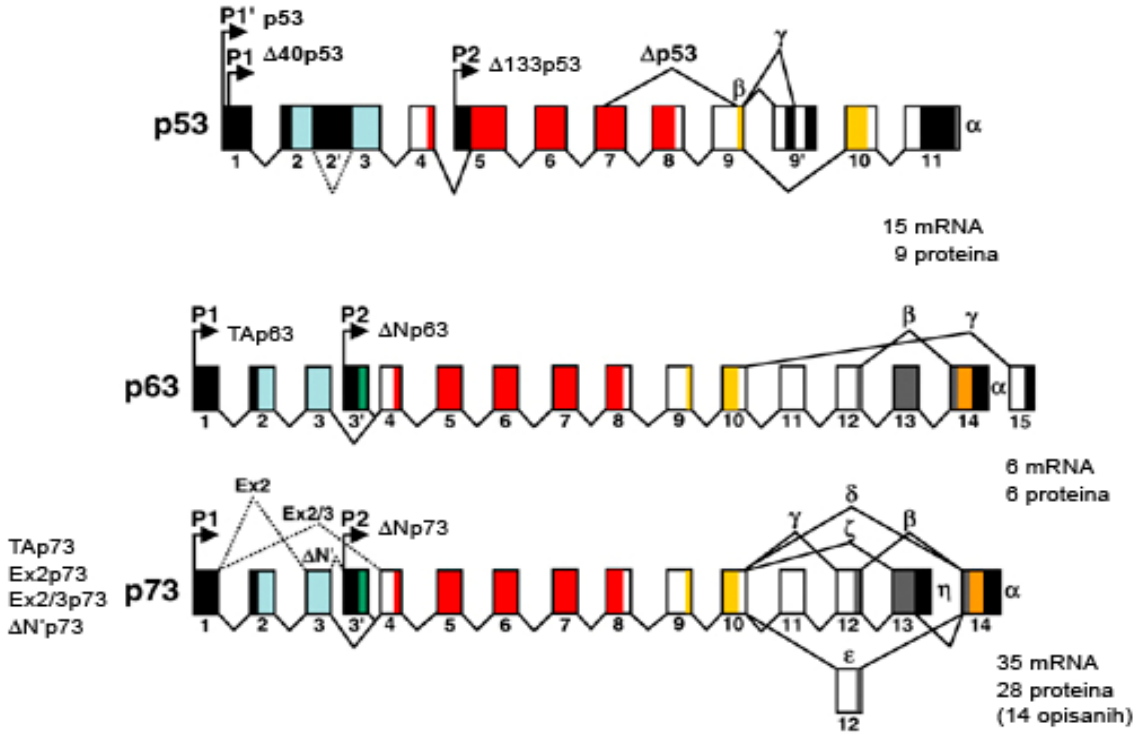
Istraženi su i brojni drugi tumor supresorski geni koji različitim mehanizmima zaustavljaju staničnu proliferaciju blokirajući trankripcijske faktore (npr. pRb), ili inhibirajući ciklin ovisne kinaze (npr. p16, p21, p27, p57) (Labar, 2001).

2.2 Obitelj gena *TP53*

Tumor supresorski gen *TP53* ima ključnu ulogu u tumorigenezi, te se naziva zaštitnikom genoma (Melino i sur., 2002). Protein p53 transkripcijski je faktor, veže se na više od 300 različitih promotora, te tako regulira ekspresiju gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa, odnosno apoptozu. Njegova inaktivacija kao posljedica delecije, mutacije ili interakcije sa staničnim ili virusnim proteinima ključni je korak u nastanku preko polovine tumora čovjeka (Levrero, 2000).

Otkriven je 1979. kao stanični protein koji ulazi u interakciju s onkogenim T antigenom virusa SV40 (Levine i sur., 1979; Lane i sur.,1979). Naknadno su otkriveni i srodnici gena *TP53* – *TP63* i *TP73*. *TP73* otkriven je 1997. na položaju 1p36.2-3, regiji kromosoma koja je često deletirana u neuroblastomima, tumorima kolona, melanomima i tumorima dojke (Kaghad i sur., 1997), a 1998. i gen *TP63*, smješten na položaju 3q27-29, regiji kromosoma često udvostručenoj u različitim vrstama tumora, što ukazuje na njegov mogući onkogeni učinak (Yang i sur. 1998). Iako su svi članovi obitelji gena strukturno vrlo slični te kodiraju strukturno i funkcionalno slične proteine, među njima postoje i značajne razlike (Kaghad i sur., 1997; Yang i sur., 1998). Svi geni obitelji *TP53* imaju brojne izoforme nastale alternativnim izrezivanjem i/ili prepisivanjem s alternativnog promotora (slika 1).

Danas je jasno da, bez obzira na sličnost, članovi obitelji imaju vlastiti identitet. Geni *TP53/TP63/TP73*, odnosno njihove izoforme, imaju različite uloge u razvoju i diferencijaciji, regulaciji transkripcije i apoptoze, odnosno u tumorigenezi i upitno je može li ih se smatrati klasičnim tumor supresorskim genima (Zorić i sur., 2010).



Slika 1. *Struktura gena TP53,TP63 i TP73.*

Brojevi ispod kućica prikazuju eksone, crna boja kućica prikazuje nekodirajuće regije. Strelice prikazuju različita mjesta početka transkripcije izoformi p53-Δ40p53 i Δ133p53, TAp63/p73 i ΔNp63/p73.

2.2.1 Struktura proteina p53 i njegovih srodnika

Članovi obitelji p53 imaju značajnu strukturnu sličnost. Svi članovi imaju tri glavne regije karakteristične za transkripcijske faktore: na amino (N) kraju nalazi se transaktivacijska regija (TAD, od engl. *transactivation domain*), središnja i najveća je DNA vezna regija (DBD, od engl. *DNA-binding domain*), te na karboksilnom (C) kraju nalazi se oligomerizacijska regija (OD, od engl. *oligomerization domain*) (Bénard i sur., 2003). Između DNA veznog i oligomerizacijskog područja nalazi se područje – signal za smještaj u jezgru (NLS, od engl. *nuclear localization signal*). Uz navedeno, svaki član obitelji sadrži barem jedno područje bogato prolinom (PRD, od engl. *proline rich domain*).

Protein p53 ima dva aktivacijska područja (AD1 i AD2, od engl. *activation domain*) na N-kraju, te bazno područje (BD, od engl. *basic domain*) na C-kraju. Proteini p63 i p73 imaju na N-kraju jedno aktivacijsko područje (AD1), dok na svome C-kraju imaju inhibitorno područje, te područje sa sterilnim α-motivom (SAM, od engl. *sterile α-motif*) (Scoumanne i sur., 2005). Svi geni sadrže dva promotora - P1 smješten uzvodno od eksona 1, te P2 smješten unutra eksona 3 (*p63* i *p73*), odnosno eksona 4 (*p53*). Ovisno o aktivnosti pojedinih promotora, nastaju dvije glavne skupine proteina - proteini pune duljine koji sadrže transaktivacijsko područje - *TAp63* i *TAp73*, divlji tip *TP53* (korištenjem promotora P1), te proteini bez transaktivacijskog područja, kojima nedostaje dio N-kraja - ΔNp53, ΔNp63 i ΔNp73 (korištenjem promotora P2) (Zorić i sur., 2010) (slika 2).



***Slika 2**. Usporedna struktura proteina p53/p63/p73*

Osnovni elementi strukture proteina p53, p63 i p73: transaktivacijsko područje (TAD, od engl. transactivation domain), područje bogato prolinom (PXXP), DNA vezno područje (DBD, od engl. DNA-binding domain), signalno područje za smještanje u jezgru (NLS, od engl. nuclear localisation signal), oligomerizacijsko područje (OD, od engl. oligomerization domain), područje sa sterilnim α-motivom (SAM, od engl. sterile α-motif), inhibitorno područje (od engl. inhibitory domain) te bazno područje (BD, od engl. basic domain).

Kombiniranjem prepisivanja promotora P1 s alternativnim izrezivanjem na N-kraju nastaju dodatne izoforme proteina, kojima nedostaju pojedini eksoni (Scoumanne i sur., 2005). Izoforme kojima nedostaje dio N-kraja (ΔN) funkcionalno se razlikuju od izoformi sa cjelovitim TA područjem. Alternativnim izrezivanjem 3' kraja gena *TP63* i *TP73*, od eksona 10-14, nastaje devet dodatnih izoformi proteina p73, označenih slovima α-φ, odnosno 3 dodatna p63 (α,β i γ) (Ishimoto i sur., 2002; Yang i sur., 1998; Kaghad i sur., 1997; Stiewe i sur., 2002).

Također, do danas je poznato devet varijanti proteina p53. Korištenjem promotora P1, ali uz različito inicijacijsko mjesto u odnosu na divlji tip p53 ili alternativnim izrezivanjem introna 2 nastaje izoforma Δ40p53, a prepisivanjem s promotora P2 nastaje Δ133p53. Dodatnim izrezivanjem C-kraja, odnosno introna 9, nastaju izoforme α, β i γ (Bourdon i sur., 2005; Ghosh i sur., 2004).

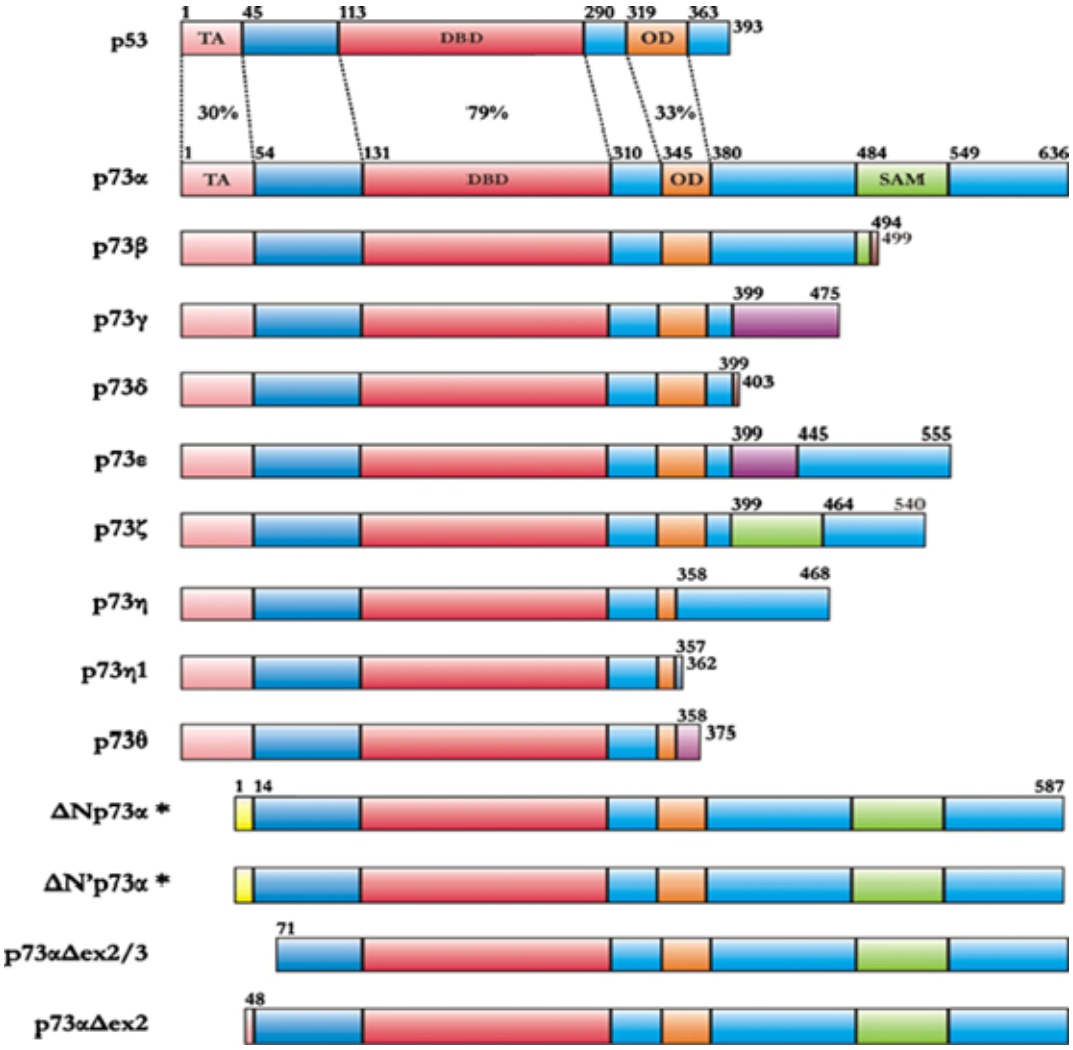
ΔNp73 snažno inhibira funkciju divljeg tipa p53, TAp63 i TAp73, te je često dereguliran u tumorima (Becker i sur., 2006; Concin i sur., 2004; Zaika i sur., 2002). ΔNp63 i ΔNp73 imaju dominantno-negativan utjecaj na aktivnost proteina TAp63 i TAp73 (Moll i Slade, 2004), te mogu direktno inaktivirati njihove ciljne gene (Wu i sur., 2003; Liu i sur., 2004). Najnovija istraživanja pokazala su da i ΔNp53, te p53β i p53γ imaju inhibirajući učinak na aktivnost TAp73 (Zorić i sur., u pripremi).

2.3 Gen *TP73* - onkogen ili tumor supresorski gen

Kao i gen TP53, gen TP73 inducira oštećenje DNA, te uzrokuje zaustavljanje staničnog ciklusa ili apoptozu sprečavajući tako nastanak tumora. Međutim, za razliku od TP53, koji je u većini tumora mutiran, TP73 nije klasičan tumor supresorski gen. U različitim je tumorima prekomjerno eksprimiran, gotovo nikada mutiran, a TP73 *knock down* miševi ne razvijaju tumore (Moll i Slade, 2004). Međutim, stvaranjem TP73 *knock down* miševa za određenu izoformu p73 (TAp73 ili ΔNp73) otkrivena je uloga pojedine izoforme u spečavanju nastanka tumora i održavanju integriteta genoma (Tomasini i sur., 2008; Wilhelm i sur., 2010). Tako $TAp73^{-/-}$ miševi (kojima je specifično deletiran TAp73, ali ne i ΔNp73) razvijaju spontane tumore, osobito pluća i adenokarcinome, te su više osjetljivi na kemijske karcinogene (Tomasini i sur., 2008). Time su potvrđena prijašnja saznanja da gen p73 sintetizira brojne izoforme proteina koje

pokazuju dvojako djelovanje u karcinogenezi (slika 3). Tako izoforme TAp73 pokazuju tumor supresorski učinak - potiču zastoj staničnog ciklusa i apoptozu, dok izoforme ΔNp73, kojima nedostaje transaktivacijsko područje, imaju onkogeni učinak. One sprečavaju apoptozu izravno inhibirajući TAp73 i p53, odnosno neizravno sprečavajući njihovu transkripcijsku aktivnost (Daskalos i sur., 2011). ΔNp73 djeluje kao dominantno-negativni inhibitor svih transktivacijskih članova obitelji p53 (p53, TAp63, TAp73). Budući da mu nedostaje transaktivacijska regija, ali posjeduje funkcionalnu DNA-vezujuću regiju, natječe se s p53, TAp63 i TAp73 u vezivanju za genske promotore, inhibirajući tako aktivaciju njihovih ciljnih gena (Oswald i sur., 2008). Ekspresiju ΔNp73 potiču p53 i TAp73 vezivanjem za specifična vezna mjesta unutar promotorske regije P2, te se na taj način ostvaruje negativna povratna sprega koja kontrolira aktivnost p53 i TAp73 (Zaika i sur., 2002).

Stoga, razmatrajući s jedne strane jasan tumor supresorski učinak izoforme TAp73 (izazivanje apoptoze, zaustavljanje staničnog ciklusa) odnosno onkogeni, dominantno-negativan inhibicijski učinak izoforme ΔNp73 na p53 i TAp73 i njihove transaktivacijske aktivnosti - možemo govoriti o funkciji „dva gena u jednom“ (Zorić i sur., 2010).



***Slika 3**. Struktura izoformi proteina p73*

*Različitim izrezivanjem N- i C- kraja proteina p73 nastaju različite izoforme. Izoforme ΔN nastaju prepisivanjem s promotora P2 koji se nalazi u području ekson/intron 3. Izoforme ΔN' nastaju prepisivanjem s promotora P1 i sadrže sve eksone od 1 do 14 s dodatnom insercijom eksona 3. *Međutim, zbog različitih mjesta početaka translacije konačni proteini ΔN i ΔN' su identični.*

TA - transaktivacijsko područje; DBD - DNA vezno područje; OD - oligomerizacijsko područje; SAM - područje sa sterilnim α motivom.

2.3.1 Uloga gena *TP73* u tumorigenezi

Kao što je već rečeno, dosadašnjim istraživanjima dokazano je da gen *p73* odudara od klasičnog Knudsonovog tipa tumor supresorskog gena, i dok se mutacije *p53* nalaze u više od polovine tumora, mutacije *p73* su rijetke. Smješten je na kromosomskoj regiji 1p36, regiji koja je često deletirana u tumorima. Gubitak heterozigotnosti gena *p73* zabilježen je u neuroblastomima (Ichimiya i sur., 1999), tumorima pluća (Nomoto i sur., 1998) i jajnika (Imyanitov i sur., 1999).

Budući da je gen *p73* rijetko mutiran, za proces tumorigeneze važnija je promjena ekspresije *p73* od gubitka njegove funkcije (Bénard i sur., 2003). Također, zapažena je viša razina ekspresije proteina ΔNp73 u nekim tumorima u odnosu na tkiva iz kojih potječu (tumor pluća, kolona, dojki, mjehura, jetre, jajnika, neuroblastom) što upućuje na lošiju prognozu tijeka bolesti (Levrero i sur., 2000; Concin i sur., 2004; Sun, 2002; Zaika i sur., 2002). I TAp73 i ΔNp73 pojačano su eksprimirani u većini tumora, a TAp73 aktivira transkripciju ΔNp73, dok potonji funkcionalno inhibira TAp73 protein stvarajući komplekse TAp73/ΔNp73 (Slade i sur., 2004). Mutacija p53 može dovesti do smanjene aktivnosti TAp73, a sličan učinak ima i povišena transkripcija ΔNp73 i ΔNp63, sprečavajući na taj način značajniji tumor supresorski učinak TAp73 (Rosenbluth i Pietenpol, 2008; Deyoung i sur., 2007; Zaika i sur., 2002). Sposobnost ΔNp73 ili mutiranog p53 da inhibira TAp73 može otklanjati potrebu za mutacijom *TP73* tijekom tumorigeneze.

Pojačana ekspresija proteina p73, odnosno promijenjena ekspresija njegovih izoformi najčešći je nalaz u mnogim zloćudnim bolestima u ljudi. Također, postoji korelacija između ekspresije pojedinih izoformi p73, posebice varijanti TAp73 i ΔNp73, i kemorezistencije ovih bolesti (Concin i sur., 2005; Pluta i sur., 2006; Meier i sur., 2006). Pojačana ekspresija ΔNp73 u različitim tipovima tumora, posebice u onima s funkcionalnim p53, kojeg inhibira, potvrđuje hipotezu da izoforma ΔNp73 ublažuje selekcijski pritisak za mutacijama *TP53* (Concin i sur., 2004, Zaika i sur., 2002, Hofstetter i sur., 2010).

Najnovije studije ukazuju na razlike između TAp73α i TAp73β u vezanju na promotorske regije ciljnih gena, posebice motiv AP1. Nađeno je da se TAp73α simultano s transkripcijskim faktorom c-Jun veže za AP1 vezno mjesto i tako zajedno sudjeluju, međuostalim, u poticanju apoptoze. Nasuprot, TAp73β smanjuje vezanje c-Jun za DNA i tako ekspresiju ciljnih gena, pa i samog c-Jun (Koeppel i sur., 2011).

2.3.2 Uloga gena *TP73* u razvoju i diferencijaciji

Gen *TP73* ne pokazuje samo aktivnost vezanu za tumorigenezu, već ima jedinstvenu ulogu u razvojnim procesima. Pokusima na *TP53 knock down* miševima utvrđeno je da spontano razvijaju tumore, za razliku od *TP73 knock down* miševa koji ne razvijaju tumore, ali imaju niz regulacijskih poremećaja (diferencijacija ektoderma, neurogeneza, dinamika cerebrospinalnog likvora sa pojavom hidrocefalusa, respiratorne sluzi, kronične infekcije i upale, poremećaj feromonskih receptora) (Yang i sur., 1999). Kao što je već navedeno, nedavno je znanstvenicima uspjelo dobiti miševe koji imaju selektivni nedostatak bilo TAp73 ili ΔNp73 izoforme. Tako je ustanovljeno da je miševi kojima nedostaje samo ΔNp73 (*ΔNp73*$^{-/-}$ miševi) pokazuju znakove neurodegeneracije (Wilhelm i sur., 2010), što je potvrdilo prijašnja saznanja o neuropreotektivnoj ulozi ΔNp73 (Pozniak i sur., 2000). Za razliku od *ΔNp73*$^{-/-}$ miša, miš kojemu nedostaje samo TAp73 ima poremećaj u razvoju živčanog sustava, posebice hipokampusa (Tomasini i sur., 2008). Dakle, neometana ekspresija izoforme TAp73 važna je za normalni razvoj živčanog sustava, premda je predominantno eksprimirana izoforma u razvoju mišjeg mozga ΔNp73. Smatra se da ΔNp73 ovdje igra ključnu ulogu sprečavajući apoptotsko odumiranje neurona potaknuto djelovanjem *TP53* (Pozniak i sur., 2000). Pad koncentracije neuralnog faktora rasta (NGF), koji je neophodan za životni vijek mišjih neuronskih stanica simpatičkog sustava, dovodi do ekspresije p53 i smrti stanice. Također, pad koncentracije NGF dovodi do sniženja ekspresije ΔNp73, međutim odumiranje neurona biti će smanjeno ukoliko se ekspresija ΔNp73 pojačano eksprimira. Stoga je jasno da ΔNp73 direktno utječe na djelovanje NGF, vjerojatno mehanizmom promotorske kompeticije s p53 (Pozniak i sur., 2000).

p73 ima ulogu i u diferencijaciji. Dodatak retinoične kiseline uzrokuje pojačanu ekspresiju p73 što rezultira spontanom diferencijacijom neuroblastičnih stanica (Kovalev i sur., 1998).

Ekspresija pojedinih izoformi izrezanih na C-kraju korelira s normalnom mijeloidnom diferencijacijom. Tako su izoforme TAp73α i TAp73β povezane s normalnom diferencijacijom mijeloidnih stanica, dok su izoforme γ, δ, ε i θ povezane s pojavom leukemičnih blasta, štoviše TA73ε je specifičan za leukemične blaste (Tschan i sur., 2000). Izoforme TAp73γ i TAp73δ sudjeluju u terminalnoj diferencijaciji keratinocita ljudske kože (De Laurenzi i sur., 2000). Novije studije ukazuje na ulogu TAp73α u poticanju rasta, djelujući uzajamno sa transkripcijskim faktorom c-Jun, koji regulira rast i apoptozu (Koeppel i sur., 2011).

2.4 Epigenetička zbivanja

Projektom genoma čovjeka dobili smo nacrt „temelja života“, međutim način na koji ljudski genom funkcionira i na čemu se temelje razlike između jedinki ostao je nerazjašnjen. Kako je moguće da jednojajčani blizanci, koji su genetički identični imaju antropomorfijske razlike i bolesti- npr. jedan od njih je autističan? Ili genetički identični miševi imaju različitu boju krzna? Navedene pojave ne mogu se objasniti samom strukturom gena, već je očito da postoje nasljedne kemijske modifikacije gena koje zahvaćaju njihovu ekspresiju, ali ne i strukturu. Odgovore na postavljena pitanja daje nam epigenetika, koja se može shvatiti kao mehanizam koji potiče i održava nasljedne, dijelom reverzibilne obrasce ekspresije i funkcije gena bez promjene građe genoma. Na taj način epigenetika objašnjava kako isti genotip može rezultirati različitim fenotipovima (Bradbury, 2003; Esteller, 2006). Ako genetika daje saznanja o građi - „anatomiji“ genoma, možemo reći da epigenetika proučava mehanizme regulacije aktivnosti pojedinih gena odnosno njihovu „fiziologiju“ . Pri tome, za razliku od epigenetike koja je fokusirana na promjene aktivnosti pojedinih gena, ili skupina gena, epigenomika objedinjuje takve, ali globalne analize čitavog genoma. Tvorcem pojma epigenetike smatra se razvojni biolog Conrad Waddington (1905.-1975.) koji je prvi razvoj organizma shvatio kao epigenetički događaj, odnosno diferencijaciju pojedinih organa kao posljedicu međudjelovanja genotipa, epigenotipa i vanjskih čimbenika. Na taj način objašnjava zašto jedinke istog genotipa imaju različit fenotip, koji postaje nasljedan kroz generacije (Gall Trošelj i sur., 2009).

2.4.1 Epigenetički mehanizmi

Epigenetički biljezi imaju ključnu ulogu u modifikaciji aktivnosti gena- tijekom razvoja i diferencijacije stanica, ali i u nastanku zloćudnih bolesti, imunološkom odgovoru organizma, zaštiti od ugradnje virusnog genoma i sl. Uključuju metiliranost DNA, posttranslacijske histonske modifikacije dodavanjem malih kovalentnih grupa (acetilacija, fosforilacija, metilacija, poliADP-ribozilacija i ubikvitinizacija), ili relativno velikih proteina (sumoilacija), remodeliranje kromatina, te djelovanje malih, nekodirajućih molekula RNA (Jablonka i Lamb, 2002; Duenas-Gonzales i sur., 2005; Shilatifard, 2006; Esteller, 2006). Transkripcija gena ovisi o stanju kromatina. Kromatin predstavlja organizacijsku jedinicu stanične DNA eukariota i građen je od nukleosoma. Nukleosom se sastoji od 146 parova baza DNA, omotanih oko histonske oktamerne jezgre koju čine proteini H2A, H2B, H3 i H4. Posttranslacijske promjene histona određuju dostupnost kromatina transkripciji, a time i reguliranju ekspresiju gena (Jain i sur., 2009). Histoni igraju važnu ulogu u epigenetičkoj mreži. Acetilacija odnosno metilacija histona na aminokiselini lizinu, te metiliranje aminokiseline arginin u histonima H3 i H4 igra važnu ulogu u odmatanju kromatina i ekspresiji gena (Jenuwein and Allis, 2001; Bannister i Kouzarides, 2004; Daniel i sur., 2005). Ključnu ulogu u navedenim zbivanjima imaju enzimi deacetilaze histona (HDAC, od engl. *histone deacetylase*) koje zaustavljaju transkripciju, odnosno histon-acetiltransferaze (HAT, engl. *histone acetylase*) koje aktiviraju transkripciju. Suprotno prethodno opisanom „odmatanju“ kromatina potaknutog enzimom HAT, deacetilacija histona posredovana HDAC dovodi do „zgušnjavanja“ kromatina sprečavajući na taj način pristup transkripcijskim faktorima s posljedičnim sprečavanjem transkripcije (Esteller i Herman, 2002; Gall-Trošelj i sur, 2009). Smanjena acetilacija histona uz pojačanu metilaciju DNA karakteristična je za utišana genomska područja „normalnih“ gena – npr. X-kromosom u muškaraca, upisani ili tkivno specifični geni, te područja transpozona (Esteller, 2006). Dodatne histonske modifikacije predstavljaju fosforilacija histona (dovođenjem ionski negativnih fosfatnh grupa na histonske repove olabavljuju vezu DNA i histona te tako omogućuju regulaciju transkripcije i popravak DNA (Banerjee i Chakravarti, 2011), zatim ubikvitinacija (vezanje ubikvitina, regulatornog proteina koji sadrži 76 aminokiselina) na aminokiselini lizin unutar histona (Zhu i Wani, 2010), te sumoilacija - dodavanje proteina, sličnog ubikvitinu, veličine stotinjak aminokiselina (SUMO, od engl. *Small Ubiquitin-like Modifier*) kovalentnom vezom na jezgrine, ali i neke citoplazmatske proteine,

uglavnom na aminokiselini lizin. Sumoilacija pomaže u staničnoj kontroli stresa, apoptoze, unutarstaničnog transporta, te aktivnosti transkripcijskih faktora (Lomeli i Vazquez, 2011).

Svako od navedenih epigenetičkih zbivanja ne može se promatrati izdvojeno, samo za sebe, već u kontekstu ukupnih epigenomskih promjena unutar stanice. Danas je jasno da hipermetiliranost otoka CpG uz deacetilaciju H3 i H4, metilaciju lizina 9 u H3, sumoilaciju H4, te smanjena metilacija lizina 4 u H3, predstavlja mehanizam zaustavljanja ekspresije gena (Laird, 2005).

2.4.2 Utjecaj metiliranja DNA na ekspresiju gena i tumorigenezu

Metiliranje DNA je dinamičan, reverzibilan mehanizam epigenetičke regulacije ekspresije gena, održavanja integriteta i stabilnosti DNA, modifikacije kromatina i nastanka mutacija. Predstavlja kovalentno dodavanje metilnih skupina (CH_3) na citozinske baze DNA (najčešće slijed CpG). Gotovo 60% gena čovjeka u području promotora, na 5´ kraju posjeduje područja bogata citozinom i gvaninom koji se nazivaju otoci CpG, od kojih je većina nemetilirana u svim tkivima tijekom razvoja (Antequera i sur., 1993; Bird i sur., 1987). Definiraju se kao odsječci od 500 parova baza sa sastavom CG od najmanje 55% i očekivanom učestalosti CpG od najmanje 0,65 (Takai i sur., 2002). Tri do četiri posto svih citozina u genomu čovjeka je metilirano, a 5-metilcitozin predstavlja približno 1% svih nukleotidnih baza normalne ljudske DNA (Esteller, 2005). Metiliranu DNA prepoznaju transkripcijski proteini koji tada ne vrše svoju ulogu. Premda je većina CpG otoka u normalom stanju nemetilirana, u nekim slučajevima normalnog razvoja ljudskog organizma nalazimo ih metilirane, što omogućuje normalan rast i razvoj jedinke. Takvi primjeri su upisani geni, kod kojih hipermetilacija jednog alela (npr. supresora rasta) u zametnim stanicama dovodi do ekspresije drugog alela, zatim inaktiviranje gena jednog X kromosoma u žena, te sprečavanje ekspresije pojedinih tkivno specifičnih gena u tkivu u kojem ne bi trebali biti aktivni (Baylin i sur., 1998; De Smet i sur., 1999; Torre i sur., 2000). K tome, metiliranje DNA izvan otočića CpG u fiziološkim uvjetima moglo bi imati ključnu ulogu u sprečavanju transkripcije transpozona (Esteller, 2006).

Ključnu ulogu u procesu metilacije imaju enzimi DNA-metiltransferaze (DNMT). DNA-metiltransferaze 3a i 3b (DNMT3a i DNMT3b) kataliziraju metiliranje *de novo*, odnosno

stvaranje „obrasca“ metilacije, dok se DNMT1, koja katalizira metilaciju polumetilirane molekule DNA na dinukleiotidima CpG u stanicama kćeri, smatra odgovornom za održavanje pravilne razine metiliranosti tijekom replikacije i popravka DNA, odnosno kopiranje uspostavljenog obrasca (Okano i sur., 1999; Howell i sur., 2001; Duenas-Gonzales i sur., 2005). Obrazac metilacije je nasljedan i ovisi o tkivu i vrsti, a promjene obrazaca metilacije uobičajene su u stanicama raka (Jones i sur., 2002).

Kontrola stanične metilacije, histonske modifikacije, remodeliranja kromatina i aktivnosti malih molekula RNA ključne su u poremećaju staničnog života, pa tako i karcinogenezi. Tako hipermetiliranost otoka CpG unutar promotorske regije pojedinih gena inhibira transkripciju, doprinoseći na taj način utišavanju tumor supresorskih gena (Esteller i Herman, 2002). Neki od ključnih gena u biologiji tumora utišanih na taj način su *P16INK4a* (inhibitor staničnog ciklusa), *P14ARF* (regulator p53), geni koji sudjeluju u popravku DNA- *hMLH1*, *BRCA1*, *MGMT*, *E-cadherin* (gen važan za kontrolu adherentnosti stanice), odnosno estrogenski i retinoidni receptori (Esteller i Herman, 2002). Istovremeno, uz hipermetiliranost promotora pojedinih tumor supresorskih gena (koja je karakteristična za svaki pojedini tip tumora), u zloćudnoj bolesti nalazimo istovremenu globalnu hipometiliranost genoma, pri čemu maligne stanice imaju 20-60% manje genomskog metiliranog citozina u odnosu na zdrave stanice istog tipa. To se prvenstveno odnosi na hipometiliranost kodirajućih regija i introna gena, te demetilaciju ponavljajućih sekvenci koje čine gotovo 30% ljudskog genoma (Esteller, 2006). To dovodi do kromosomske nestabilnosti, s posljedičnim gubitkom heterozigotnosti, zatim reaktivacije ranije spomenutih transpozona (parazitskih unutargenomskih dijelova DNA), te reaktivacije upisanih gena (Esteller, 2006).

Premda se smatralo da je divlji tip p53 rijetko utišan procesom metilacije (Agiree i sur., 2003), u posljednjih nekoliko godina nekoliko studija je pokazalo da je metilacija novi mehanizam kojim se regulira p53. Doista, metilacija lizina pojačava ili suprimira transkripcijsku aktivnost p53. Tako metilacija lizina na specifičnim mjestima na C-kraju proteina povećava ili smanjuje transkripcijsku aktivnost p53 ovisno o mjestu metiliranosti. Lizin specifična demetilaza KDM1 (LSD1) posreduje demetilaciju *p53*, i tako sprečava interakciju p53 sa svojim ko-aktivatorom 53BP1, važnim za izazvanje apoptoze.

Protein arginin metiltransferaze CARM1 i PRMT1 su ko-aktivatori p53 uključeni u metilaciju u histona H3 i H4, te tako posreduju transkripcijska aktivnost p53. Stoga u odgovoru

na stanični stres, međudjelovanje metilacije i demetilacije *p53*, uz druge posttranslacijske promjenae podešava aktivnost p53 u konačnici djelujući na stvaranje tumora (Scoumanne i Chen, 2008).

Gubitak funkcionalnog proteina p53 rezultira izrazito pojačanom ekspresijom DNMT1 (Peterson i sur., 2003). Naime, nađeno je da p53 tvori kompleks s DNMT1 i na taj način ga inhibira i sprečava metilaciju. Gubitkom p53 dolazi do poremećaja metilacije DNA, rasprostranjene metilacije otoka CpG, te posebice utišavanja drugih tumor supresorskih gena. Mutirani pak *TP53* ima čestu promjenu citozina u timin na metiliranim dinukleotidima CpG (Peterson i sur., 2003).

2.4.3 Metode otkrivanja metilirane DNA

U posljednjih desetak godina došlo je do značajnog napretka u razvoju metoda koje se koriste u analizi metiliranosti DNA. Od početnih analiza, ograničenih na određene lokuse, danas smo u mogućnosti vršiti analize na čitavom genomu s rezolucijom od jednog para baza. Raspoređenost metilnih skupina može prenositi epigenetičku informaciju označavajući transkripcijski aktivne ili utišane regije. Međutim, da bi metilacijski biljeg ostao vidljiv i nakon hibridizacije razvijeni su tretmani DNA koji prethode određivanju metiliranosti u svrhu očuvanja metilnih biljega (Laird, 2010.) Budući da su uzorci DNA uglavnom dobiveni iz kolekcije stanica koje mogu imati različite metilacijske obrasce, distribucija metiliranosti citozina na poziciji 5 ugljika (5mC) u pojedinom uzorku može biti kompleksna. Stoga se analiza može raditi ili određivanjem obrasca metiliranih ciljnih sekvenci duž pojedine molekule DNA, ili određivanjem prosječne razine metiliranosti na određenom lokusu u više molekula DNA (Laird, 2003).

Zbog česte mutacije 5mC u timin, pojedinačni 5mC često se gube, a budući da tijekom PCR ili kopiranja DNA metiltransferaze nisu prisutne, metilacijski se biljeg može izgubiti tijekom takve amplifikacije. Stoga gotovo svi postupci koji se koriste u analizi metiliranosti DNA specifične za slijed ovise o tretmanu DNA koji prethodi amplifikaciji ili hibridizaciji (Schones i Zhao, 2008; Pomraning i sur., 2009).

Najznačajnije metode u obradi genomske DNA su korištenje restrikcijskih enzima, afinitetno obogaćivanje metilirajućih regija, te bisulfitna konverzija. Nakon pripreme genomske

DNA, slijede različite molekularno-biološke tehnike (kao npr. hibridizacija i sekvencioniranje), te kombinirirajući s prethodnom obradom DNA daju brojne tehničke mogućnosti određivanja obrazaca i profila metiliranosti DNA (Laird, 2010).

Za specifično određivanje metiliranja pojedinih gena najranije studije koristile su enzime osjetljive na ograničenje metiliranja, kojima bi razgradile DNA, a potom bi slijedilo umnažanje fragmenata metodom PCR, te analiza Southern blotom (Sneider, 1980). U posljednje vrijeme razvijeno je nekoliko novijih metoda koje se temelje na obradi DNA restrikcijskim enzimima, kao npr. RLGS (*Restriction Landmark Genome Scanning)*, koja se najviše koristi za identifikaciju utisnutih gena, te mjesta specifično metiliranih u nekim tkivima ili karcinomima (Allegrucci i sur., 2007).

Također, mnoge tehnike kombiniraju enzimatske metode obrade DNA s analizama koje se temelje na tehnologiji čipova, među kojima su MCA (*Methylated CpG island amplification*), ili MCAM (*MCA with microarray hybridization*) (Omura i sur., 2008).

Umjesto hibridizacije na čipu uz tehnike obrade restrikcijskim enzimima, u novije se vrijeme kombiniraju nove tehnike sekvenciranja, koje omogućuju specifičnu analizu metiliranosti za svaki alel, s manjom količinom DNA mogu pokriti veće genomske regije, te izbjegavaju hibridizacijske nespecifične signale (npr. *Methyl-seq*) (Laird, 2010).

Za opsežnije određivanje metiliranosti DNA u kompleksnim genomima koriste se metode koje kombiniraju pojačanje afiniteta metiliranih regija upotrebom protutijela specifičnih za 5mC, ili upotrebom metil-vezujućih proteina s afinitetom za metiliranu nativnu genomsku DNA. Najznačajnije takve metode su MeDIP, mDIP ili mCIP, koje se zasnivaju na obogaćivanju metiliranih regija imunoprecipitacijom denaturirane genomske DNA s protutijelima specifičnim za metilirani citozin, nakon kojeg slijedi hibridizacija na čipovima- *tilling array* ili *microarray*) (Weber i sur., 2005), te MIRA (*Methylated CpG Island Recovery Assay*). U tim metodama ulazna i obogaćena DNA obilježavaju se fluorescentnim markerima (Laird, 2010)

U novije doba popularne su metode koje se temelje na bisulfitnom sekvencioniranju DNA. To su precizne metode kojima se analizira metiliranost neke DNA regije, a koriste obradu DNA natrijevim bisulfitom, a potom se slijedovi umnažaju metodom PCR. Pri tome dolazi do konverzije nemetiliranog citozina u timin, dok metilirani citozin ostaje nepromijenjen. Prednost je metode što treba malu količinu genomske DNA, pa je pogodna za analizu kliničkih uzoraka (Kaneda i sur., 2004).

Slična je i metoda lančanom reakcijom polimeraze specifičnom za metilaciju (MSP, od engl. *methylation specific PCR*), pri čemu se nakon djelovanja bisulfita nemetilirani citozin iz otoka CpG mijenja u uracil, dok se metilirani ne mijenja (Herman i sur., 1996).

Pirosekvencioniranje se također temelji na tretmanu DNA bisulfitom, nakon čega se DNA umnaža s početnicom koja sadrži biotin na 5´ kraju. Pritom dolazi do oslobađanja pirofosfata, a djelovanjem kaskade enzima javlja se svjetlosni signal koji bilježi kamera. Jačina signala proporcionalna je omjeru metiliranosti (Tost i Gut, 2007).

Metode zasovane na bisulfitnoj konverziji teže se prilagođavaju za hibridizacijske tehnike na čipu, te su do nedavno bile manje u upotrebi jer, uz izuzetak ostatka 5mC, bisulfitno tretirana DNA ima tri umjesto četiri baze, što rezultira smanjenom hibridizacijskom specifičnosti (Laird, 2010). Najnovija razvijena tehnologija u tom smislu je *Illumina Infinium (GoldenGate Bead Array*, *HumanMethylation BeadChip*).

Illumina HumanMethylation450 BeadChip osigurava opsežnu analizu CpG mjesta, omogućujući ispitivanje preko 485 000 metilacijskih mjesta po uzorku, uz rezoluciju od jednog nukleotida. Metilacijska mjesta pokrivaju 99% genskih regija definiranih u zbirci *Reference Sequences* (RefSeq) (genomske sekvence koje se koriste kao referentni standardi za dobro karakterizirane gene) (Pruitt i sur., 2012), s prosjekom od 17 CpG mjesta po genskoj regiji. Unutar genskih regija ispitivana metilacijska mjesta raspoređena su u promotorima, 5´UTR (*od engl. untraslated region*), prvim eksonima gena, samim genima, te 3´UTR. Metilacijska mjesta također pokrivaju 96% otoka CpG definiranih u genomskom pregledniku *Genome Browser* (Rhead i sur., 2009), te pripadajuće regije. Analiza *Illumina Infinium* mjeri metiliranost DNA koristeći kvantitativnu genotipizaciju bisulfitno konvertirane genomske DNA (Bibikova i sur., 2011; Sandoval i sur., 2011; Rakyan i sur., 2011). U tablici 1. prikazani su glavni principi suvremenih metoda analize metiliranosti DNA.

Tablica 1. *Glavni principi analize metiliranosti DNA*

Tretman DNA	**Analitički korak**			
	Analize specifične za lokus	**Analize temeljene na gelu**	**Analize temeljene na tehnologiji čipa**	**Analize temeljene na novoj generaciji sekvencioniranja**
Enzimska digestija	HpaII-PCR	Southern blot RLGS MS-AP-PCR AIMS	DMH MCAM HELP MethylScope CHARM MMASS	Methyl-seq MCA-seq HELP-seq MSCC
Poboljšanje afiniteta	MeDIP-PCR		MeDIP mDIP mCIP MIRA	MeDIP-seq MIRA-seq
Bisulfitna konverzija	MethyLight EpiTYPER Pirosekvenciranje	Sanger BS MSP MS-SnuPE COBRA	BiMP GoldenGate Infinium	RRBS BC-seq BSPP WGSBS

Preuzeto iz: Laird, PW. (2010): Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. Nat Rev Genet 11(3):191-203.

2.5 Epigenetika i liječenje raka

Reverzibilnost epigenetičkih promjena karakteristika je koja omogućuje novi pristup dijagnostici i terapiji mnogih bolesti (dijabetes, kardiopulmonalne bolesti, neurološki poremećaji, autoimune bolesti, te karcinom). Liječenje bi moglo uključivati otkrivanje ranih epigenetičkih promjena kao ranih „markera“ bolesti, uravnoteženje mreže epigenetičkih zbivanja u tzv. prekancerozama s idejom pokušaja sprečavanja razvoja karcinoma, te specifične terapije epigenomskim lijekovima koji bi procese mogli vratiti „unazad“ (Gall-Trošelj i sur., 2009).

Hipermetiliranost otoka CpG pojedinih tumor supresorskih gena specifična je za pojedine karcinome. Tako je npr. hipermetiliranost glutation S-transferaze (GSTP1) karakteristična za karcinom prostate, što može omogućiti dokazivanje tumorskih stanica u serumu ili ekskretima pacijenata koji boluju od zloćudnih bolesti (Esteller, 2006). Razvoj epigenetike doveo je i do kliničke primjene prvih lijekova, koji mogu mijenjati stanje kromatina ili obrazac metiliranja DNA (Egger i sur., 2004). Radi se o inhibitorima enzima, DNA-metiltransferaza ili histon deacetilaza, od kojih su neki već odobreni od strane američkog FDA (*Food and Drug Administration)*, ili se nalaze u fazi ispitivanja (Vidaza i Decitabin) u liječenju pacijenata koji boluju od mijelo-displastičnog sindroma (*Myeloid Displastic Syndrome*, MDS), te nekih leukemija. Oni se ugrađuju u DNA stanica koje se dijele i vežu na sve tri DNA metiltransferaze, čime inhibiraju metilaciju, te dovode do ponovne ekspresije prethodno utišanih gena (Vigna i sur., 2011; Deneberg, 2012).

Kako su principi epigenetičke terapije tek u začetku, važan problem koji će biti potrebno riješiti njihova je neselektivnost. Tako Decitabin pokazuje toksične i mutagene efekte *in vivo*, te je dokazano da može uzrokovati remodeliranje kromatina neovisno o svojoj ulozi vezanoj za metiliranost citozina (Laird, 2005). Novija klinička istraživanja usmjeravaju se prema kombinacijama lijekova-inhibitora DNA metiltransferaza i histon deacetilaza, koji bi sinergistički imali potencijalno bolji učinak na reaktivaciju epigenetički utišanih gena (Laird, 2005).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Uzgoj stanica

Za istraživanje smo koristili kulturu stanica SaOS2 Tet-ON, staničnu liniju osteosarkoma čovjeka koja eksprimira rtTA transaktivator u prisutnosti induktora (ATCC® Broj: HTB-85™, oznaka: SaOS2). Stanice su uzgajane u tekućoj hranjivoj podlozi DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) uz dodatak 10% seruma fetusa goveda (od engl. *fetal bovine serum, FBS*), 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich, SAD), 100 jedinica/ml penicilina (Pliva, Zagreb), 100 μg/ml streptomicina (Pliva, Zagreb) te 10 mM HEPES (Sigma Aldrich, SAD). Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C uz 5% CO_2 i vlažnu atmosferu.

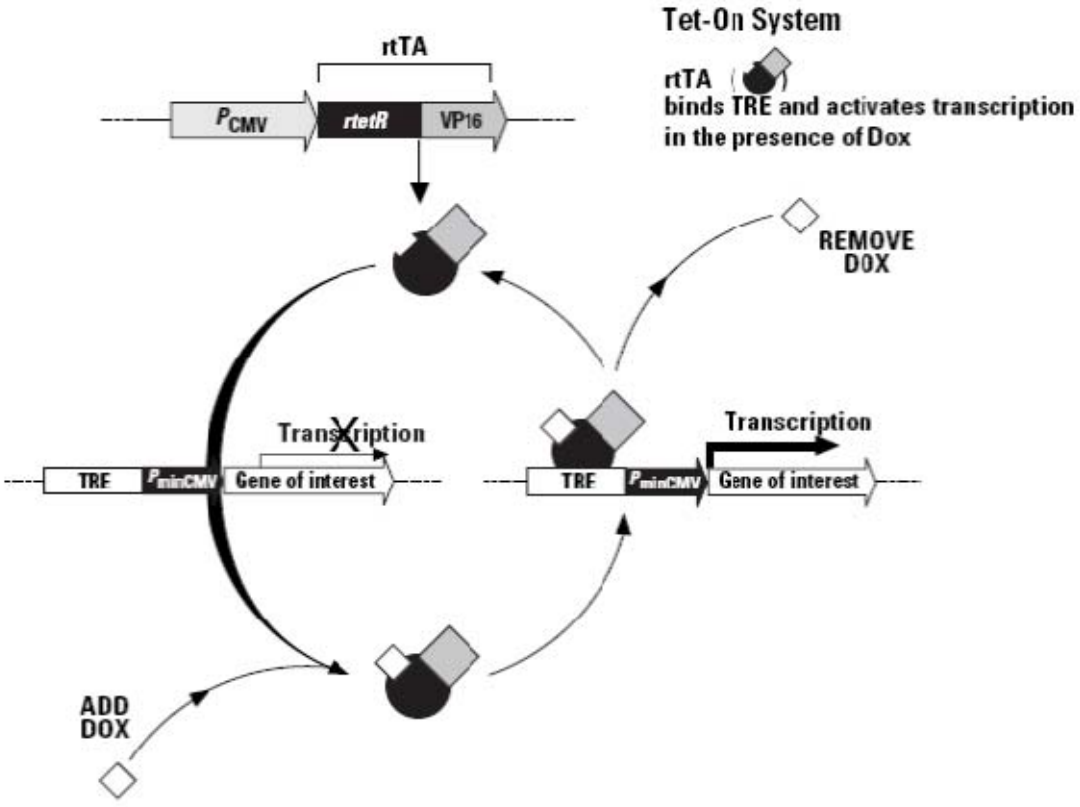
3.2 Indukcija stanica

Nakon što smo stanice izbrojali, nasadili smo 5 x 10^5 stanica u 3 mL stanične suspenzije u svaku od četiri Petrijeve zdjelice promjera 60 mm. Dvije Petrijeve zdjelice sadržavale su stanice s genom koji kodira TAp73α, a dvije s genom koji kodira ΔNp73α, oba pod kontrolom tetraciklinskog promotora (tablica 2).

***Tablica 2**. Uzorci stanica*

TAp73α + 3 μL Dox (INDUCIRANE) **(TAI)**	TAp73α – Dox (KONTROLA) **(TAK)**
ΔNp73α + 3 μL Dox (INDUCIRANE) **(ΔNI)**	ΔNp73α – Dox (KONTROLA) **(ΔNK)**

Tet-ON sustav koristi kimerički transaktivator kako bi se regulirala transkripcija gena od interesa s utišanog promotora. Transaktivator rtTA (fuzija rTetR- reverznog Tet represorskog proteina i VP16 aktivacijske domene (AD) virusa herpes simplex) eksprimiran je s konstitutivnog promotora ili tkivno specifičnog promotora. RtTA se veže za TRE (Tet Response Element) u tihom promotoru i aktivira transkripciju gena od interesa u prisutnosti induktora tetraciklina (slika 4)



Slika 4. *Shema regulacije gena kod Tet-On sustava*

rtTA se veže za TRE i aktivira transkripciju gena od interesa u prisutnosti induktora doksiciklina

Nakon 48 sati uklonili smo staru hranjivu podlogu. U dvije Petrijeve zdjelice dodali smo po 3 mL nove hranjive tekuće podloge, a u dvije po 3 mL hranjive tekuće podloge s dodatkom doksiciklina (Clontech, SAD) u konačnoj koncentraciji od 1 μg/mL.

3.3 Izolacija proteina iz stanica

Proteine smo izdvojili iz stanica 24 sata nakon indukcije. Ukratko, stanice smo sakupili strugalicom (*policeman*), prebacili u epruvetu od 15 ml i isprali još jednom hladnim sterilnim fosfatnim puferom (PBS, od engl. *phosphate buffered saline*), te centrifugirali pri 1500 × g, 7 min pri 4°C. Nakon toga supernatant smo uklonili vakuumskom sisaljkom i na stanice dodali 50 μl smjese inhibitora proteaza Complete, Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Njemačka). U uzorak smo dodali pufer za nanošenje uzoraka Laemmli, 4 × koncentriran (0,25 M Tris- HCl pH 6,8; 20% DTT; 8% Na dodecil sulfat (SDS); 40% glicerol; 0,008% bromfenolno plavilo) te sonificirali 2 × 15 korištenjem ultrazvučne sonde veličine 1 mm (1 ciklus, 80 amplituda) (Labsonic®M, B. Braun Biotech International, Sartorius group, SAD), i zagrijali u termobloku pri 95°C, 3 min. Otopine proteina odmah smo analizirali u denaturairajućem poliakrilamidnom gelu.

3.4 Određivanje koncentracije proteina metodom BCA

Koristili smo plastične pločice s 96 bunarića. U bunariće smo nanosili po 10 μl otopine albumina iz goveđeg seruma u koncentracijama 125, 250, 500, 750, 1000 i 1500 μg/ml, zatim 10 μl kvarcne vode kao slijepe probe, i 1 μl odgovarajućeg uzorka proteina razrijeđenog u 9 μl kvarcne vode. Na kraju smo u svaki bunarić dodali 200 μl reagensa BCA Protein Assay Kit (Pierce, SAD) razrijeđenog kvarcnom vodom u omjeru 1:5 i promiješali kratko na tresilici. Inkubirali smo 30 min pri 37°C te zatim izmjerili apsorbanciju pri 570 nm na čitaču ELISA (Multiskan MS Labsystems, Finska).

Sve smo radili u triplikatu. Na temelju podataka dobivenih za otopine proteina albumina različitih koncentracija izradili smo baždarnu krivulju pomoću koje smo odredili koncentraciju pojedinih uzoraka.

3.5 Elektroforeza u denaturirajućem gelu poliakrilamida

Proteine smo razdvojili u 8%-tnom denaturirajućem gelu poliakrilamida (SDS- PAGE, od engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Gel se sastoji od dva dijela puferirana kod različitog pH: donji gel za razdvajanje (tablica 3) i gornji gel za sabijanje uzoraka (5%) (tablica 4).

Tablica 3. *Sastav smjese za donji gel*

Sastojak	**Volumen/ml**
ReH_2O	4,0
30%-tna matična otopina akrilamida	3,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 %-tni SDS	0,1
10 %-tni amonijev persulfat	0,1
TEMED	0,004

Tablica 4. *Sastav smjese za gornji gel*

Sastojak	**Volumen/ml**
ReH_2O	3,4
30%-tna matična otopina akrilamida	0,83
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63
10 %-tni SDS	0,05
10 %-tni amonijev persulfat	0,05
TEMED	0,005

Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu (100 V) u puferu za elektroforezu (25 mM Tris- baza; 190 mM glicin; 0,1% Na dodecil sulfat (SDS)), dok proteini nisu došli do dna gela, što smo odredili praćenjem markera te bromfenolnog plavila. Za elektroforezu proteina koristili smo sustav Mini- Protean III (BioRad, SAD) debljine gela 1,5 mm, te proteinski marker Precision Plus Protein Standards Dual Color (BioRad, SAD).

3.6 Prijenos proteina s poliakrilamidnog gela na membranu nitroceluloze

Nakon razdvajanja proteina denaturirajućom elektroforezom u gelu poliakrilamida, proteine smo iz gela prenijeli na odgovarajuću membranu. Koristili smo nitroceluloznu membranu veličine pora 0,45 μm (BioRad, SAD) izrezanu na dimenziju 10 × 7,5 cm. Prijenos je tekao pri konstantnoj jakosti struje (200 mA, 1 sat) uz hlađenje pri 4°C, na magnetskoj mješalici u puferu za prijenos (184 mM Tris- baza; 140 mM glicin; 20% metanol). Za prijenos proteina koristili smo sustav Mini- Protean III (BioRad, SAD).

3.7. Analiza proteina metodom Western blota

Nakon prijenosa proteina na membranu nitroceluloze odredili smo učinkovitost prijenosa. Da bi vizualizirali proteine koristili smo otopinu Ponceau S (0,5% Ponceau S (Sigma, Aldrich, SAD), 10% ledena octena kiselina) u kojoj smo inkubirali membranu tijekom 5 minuta uz zibanje. Membranu smo zatim isprali tri puta u puferu TBST (150 mM NaCl; 50mM Tris; 0,5% Triton X- 100).

Nadalje, da bi spriječili nespecifično vezivanje, membranu smo inkubirali u reagensu za blokiranje- 4%-tnoj otopini nemasnog mlijeka (Nestle, Švicarska) u puferu TBST tijekom 30 min pri sobnoj temperaturi. Nakon toga membranu smo inkubirali u otopini odgovarajućeg primarnog protutijela tijekom sat vremena pri sobnoj temperaturi ili preko noći pri 4°C. Primarno protutijelo pripremili smo u reagensu za blokiranje te membranu inkubirali u otopini primarnog protutijela preko noći pri 4°C. Prije primjene sekundarnog protutijela membranu smo ispirali tri puta po 10 min u otopini TBST. U otopini sekundarnog protutijela, pripremljenog u reagensu za blokiranje, membranu smo inkubirali tijekom 60 minuta uz zibanje.

Koristili smo sekundarno protumišje protutijelo konjugirano s peroksidazom hrena (Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody, Amersham Biosciences, Engleska) u razrijeđenju 1:3000 (tablica 5).

Nakon ispiranja 30 minuta u otopini TBST membranu smo inkubirali tijekom 5 min u luminiscentnom supstratu ECL (PerkinElmer, SAD) (tablica 5), pripremljenom miješanjem otopina A i B u omjeru 1:1. Nakon toga membranu smo prekrili prozirnom plastičnom folijom te kemiluminiscencijski signal očitali na uređaju Uvidoc Cambridge Chemiluminescence Imaging system (Uvitec Cambridge, Velika Britanija).

***Tablica 5**. Primarna protutijela za p73*

Primarna protutijela za p73		
Porijeklo antitijela	**Radna koncentarcija**	**Izvor**
Protumišje α-vimentin	1:1000	Lab Vision, SAD
Protumišje ER-15	1:100	Oncogene Research Products, SAD

3.8 Izdvajanje DNA iz stanica

Genomsku DNA izolirali smo iz stanica te dodali 500 µl pufera za lizu (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA; 0,5% Tween 20). Zatim smo dodali proteinazu K (Sigma, Njemačka) do konačne koncentracije 100 µg/ml i uzorak inkubirali preko noći pri 37˚C. Sljedeći dan dodali smo jednaki volumen fenola (Kemika, Hrvatska). Laganim miješanjem tijekom 10 minuta nastale su dvije faze koje smo izmiješali u emulziju. Faze smo potom razdvojili centrifugiranjem tijekom 10 minuta pri 13 000 rpm pri sobnoj temperaturi. Gornju, vodenu fazu izdvojili smo u čistu, sterilnu epruvetu, a pročišćavanje fenolom ponovili još dva puta. Vodenu fazu smo potom pročistili s tri volumena smjese kloroform-izoamilni alkohol u omjeru 24:17. Iz pročišćene vodene faze DNA smo precipitirali hladnim (-20˚C) apsolutnim etanolom (Kemika, Hrvatska). Talog DNA smo kratko posušili pri 37˚C, otopili u puferu TE (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) i pohranili pri 4˚C.

3.9 Određivanje koncentracije DNA

Koncentraciju DNA u uzorcima odredili smo spektrofotometrijski na uređaju Lambda 25 (PerkinElmer, SAD) pri valnoj duljini od 260 nm. Pomoću izmjerene optičke gustoće, OD (eng. *optical density*), izračunali smo masenu koncentraciju DNA prema sljedećoj formuli:

c (DNA) = OD x R x 50 µg/ml

gdje je:

c - masena koncentracija (µg/ml),
OD - optička gustoća očitana pri valnoj duljini od 260 nm
R - razrjeđenje u kiveti,
ekstinkcijski koeficijent za DNA (50 µg/ml)

3.10 Elektroforeza u gelu agaroze

Izdvojenu DNA provjerili smo elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze. Agarozu smo otopili u puferu TAE (0,8 mM Tris- acetat; 0,02 mM EDTA, pH 8,0), u kojem se odvijala i elektroforeza. Prije polimerizacije u gel smo dodali etidij bromid u konačnoj koncentraciji 1 µg/ml. Prije nanošenja uzorke smo pomiješali s puferom za nanošenje na gel (0,25% bromfenol modrilo; 0,25% ksilen cijanol fluorofosfat; 30% glicerol). Elektroforeza se odvijala pri naponu od 90 V, tijekom 20 min. Za detekciju pri 254 nm i fotografiranje gelova koristili smo sustav Uvidoc Cambridge Chemiluminescence Imaging system (Uvitec Cambridge, Velika Britanija).

3.11 Kvantitativna analiza metiliranosti DNA upotrebom *Illumina HumanMethylation450 BeadChip*

Illumina HumanMethylation450 BeadChip osigurava opsežnu analizu CpG mjesta, omogućujući ispitivanje preko 485 000 metilacijskih mjesta po uzorku, uz rezoluciju od jednog nukleotida. Pokriva 99% genskih regija iz zbirke *RefSeq*, s prosjekom od 17 CpG mjesta po genskoj regiji, raspoređenih u promotorima, 5´UTR, prvim eksonima gena, samim genima, te 3´UTR. Također, pokriva 96% CpG otoka, te pripadajuće regije. Analiza *Illumina Infinium* mjeri metiliranost DNA koristeći kvantitativnu genotipizaciju bisulfitno konvertirane genomske DNA.

3.12 Određivanje metiliranosti uzoraka DNA

500 ng uzoraka genomske DNA bisulfitno je konvertirana koristeći *Zymo EZ-96 DNA Methylation Kit* (Zymo Research Corporation, SAD). Pri tome su korišteni uvjeti inkubacije preporučeni za analize *Infinum* (16 ciklusa pri 95°C tijekom 30 sekundi, te pri 50°C tijekom 60 min). DNA je obrađena za analizu koristeći *Illumina standard kit* (Illumina, SAD). Nakon bisulfitne konverzije DNA je denaturirana, izotermalno amplificirana, fragmentirana te hibridizirana na *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina, SAD). Čipovi su potom isprani, osušeni, te skenirani na *Illumina iSCAN* (Illumina, SAD). Dobivene vrijednosi su normalizirane s internom kontrolom i DNA je kvantificirana koristeći *Illumina GenomeStudio Module v1.8* (Illumina, SAD).

3.13 Statistička analiza

Početna obrada podataka i normalizacija izvršena je koristeći standardnu programsku podršku *Illumina's Genome Studio*. Normalizirani omjeri metiliranih i zbroja metiliranih i nemetiliranih signala (β-vrijednosti) korišteni su za daljnju analizu pomoću R računalne platforme (Ihaka i Gentleman, 1996) i *Bioconductor* paketa (Gentleman et al., 2004).

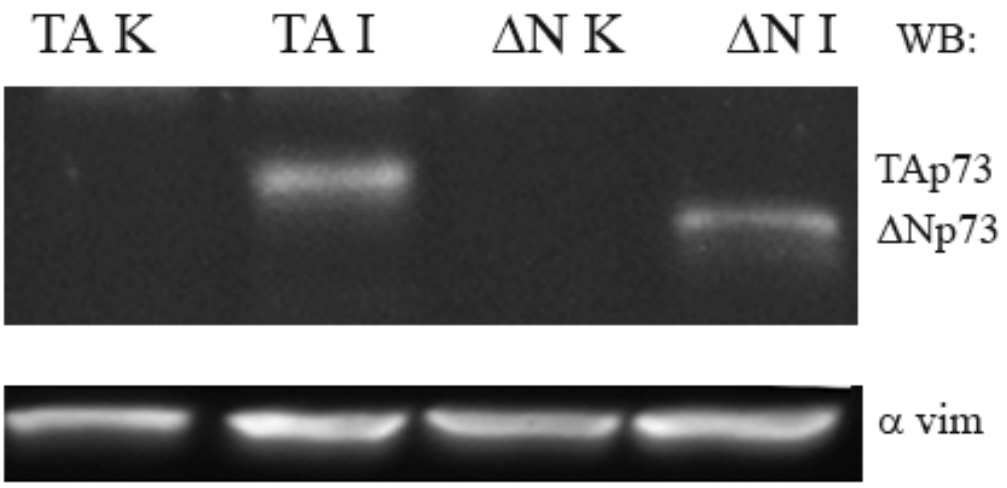
Proveden je t-test za svaka dva uzorka koja smo uspoređivali da bi se ustanovili različito metilirani lokusi za svaki CpG zasebno (~ 480 000), kao i za složenije strkukture kao što su slijedovi CpG (~ 28 000). Prilagodba p-vrijednosti višestrukih usporedbi urađena je pretvaranjem p-vrijednosti t-testa u q-vrijednosti, te upotrebom FDR (*False Discovery Rate – Ocjena Lažnog Otkrivanja)* od 0,1 kao granicom statistički značajne razlike.

4. REZULTATI

4.1 Potvrda prisutnosti induciranih proteina TAp73α i ΔNp73α u stanicama SaOS2 Tet-ON

Za pokus smo koristili stanične linije osteosarkoma čovjeka stabilno transfecirane plazmidom koji kodira za TAp73α, odnosno ΔNp73α čija ekspresija je pod kontrolom tetraciklinskog promotora. Svaku staničnu liniju podijelili smo u dva uzorka- jedan u koji smo dodali tetraciklinski antibiotik (doksiciklin), te drugi u kojem je bila ista stanična linija, ali bez dodatka doksiciklina, koja je služila kao kontrola. Stanične linije tretirane antibiotikom doksiciklinom na taj su način potaknute na transkripciju pojedinih izofomi gena p73, dok u kontrolnim staničnim linijama ekspresija izoformi proteina p73 nije očekivana.

Nakon izdvajanja proteina, ekspresiju pojedinih izoformi gena u uzorcima tretiranim doksiciklinom dokazali smo pomoću analize Western blot. U stanicama tretiranim doksiciklinom, dokazali smo prisutnost induciranih proteina TAp73α odnosno ΔNp73α. U uzorcima koji nisu tretirani antibiotikom, ti proteini nisu bili detektirani (slika 5).

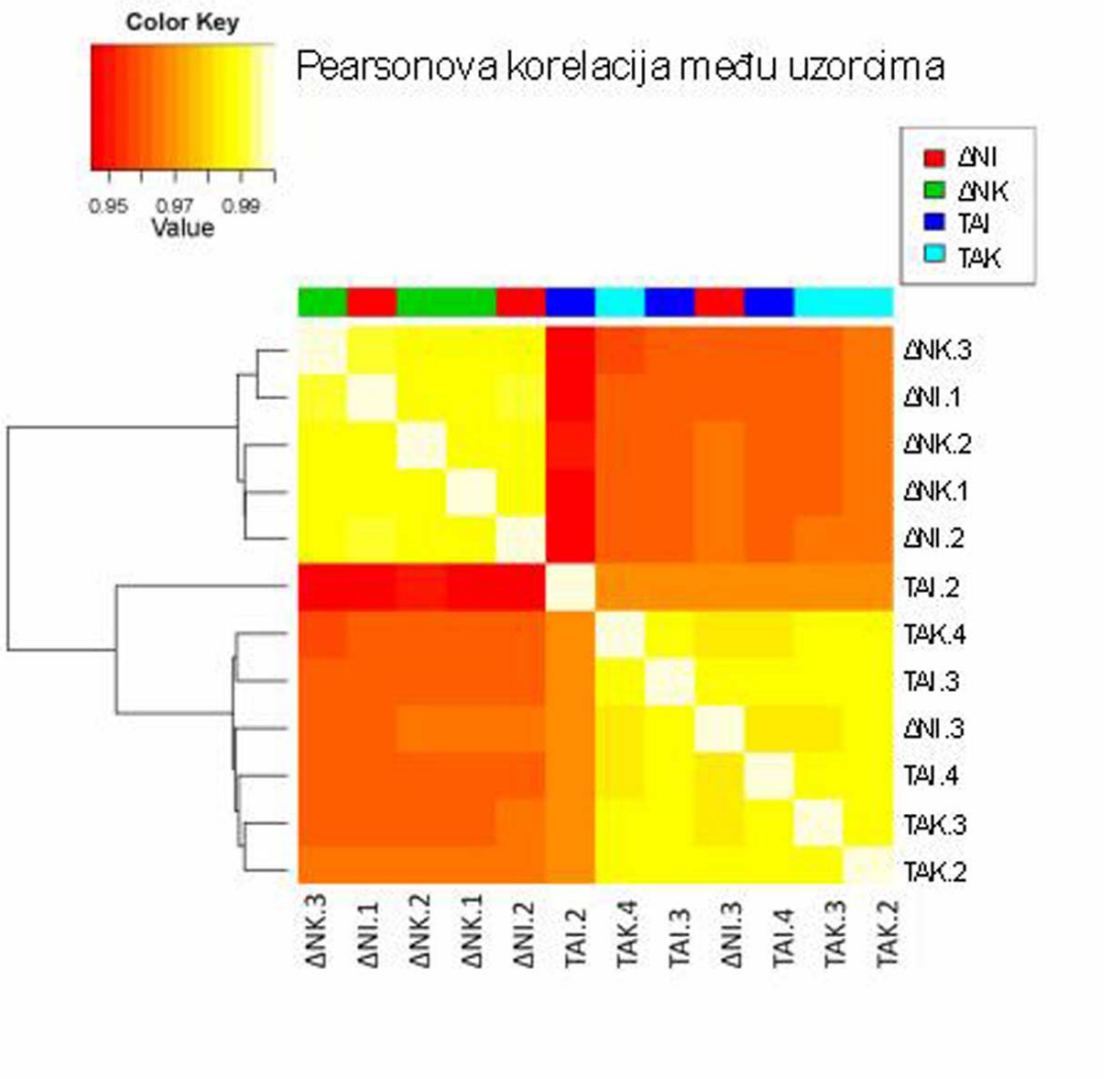


Slika 5. *Western blot analiza lizata stanica SaOS2 koje nakon indukcije tetraciklinom eksprimiraju TAp73α odnosno ΔNp73α.*

Ekspresiju smo potvrdili primjenom mišjeg monoklonalnog protutijela anti-p73 (ER 15) koje se veže za obje izoforme proteina p73 (TAp73α i ΔNp73α). Kontrolu nanošenja jednakih količina uzoraka provjerili smo primjenom primarnog protutijela za protein α-vimentin.

4.2 Analiza globalne metiliranosti DNA stanica SaOS2 ovisno o ekspresiji pojedinih izoformi p73 (TAp73α i ΔNp73α)

Za analizu globalne metiliranosti DNA koristili smo metodu *Illumina 450DNA Methylation BeadArray*, kojom se analizira metiliranost približno 480 000 mjesta CpG. Budući da smo izdvojili DNA iz tri nezavisna pokusa, imali smo ukupno dvanaest uzoraka. Iz dobivenih smo uzoraka izračunali srednju vrijednost metiliranosti genoma za svaku pojedinu staničnu liniju (TAI i ΔNI inducirani doksiciklinom, te njihove kontrole, ΔNK i TAK). Obradom (grupiranje i standardizacija podataka pomoću programa *Illumina Genome Studio*) dobivenih rezultata analize metiliranosti pojedinih uzoraka našli smo dominantno značajne razlike u metiliranosti DNA između dviju staničnih linija prije aktivacije pojedinih izoformi gena p73 (slika 6).



Slika 6: *Korelacija između svih parova uzoraka*

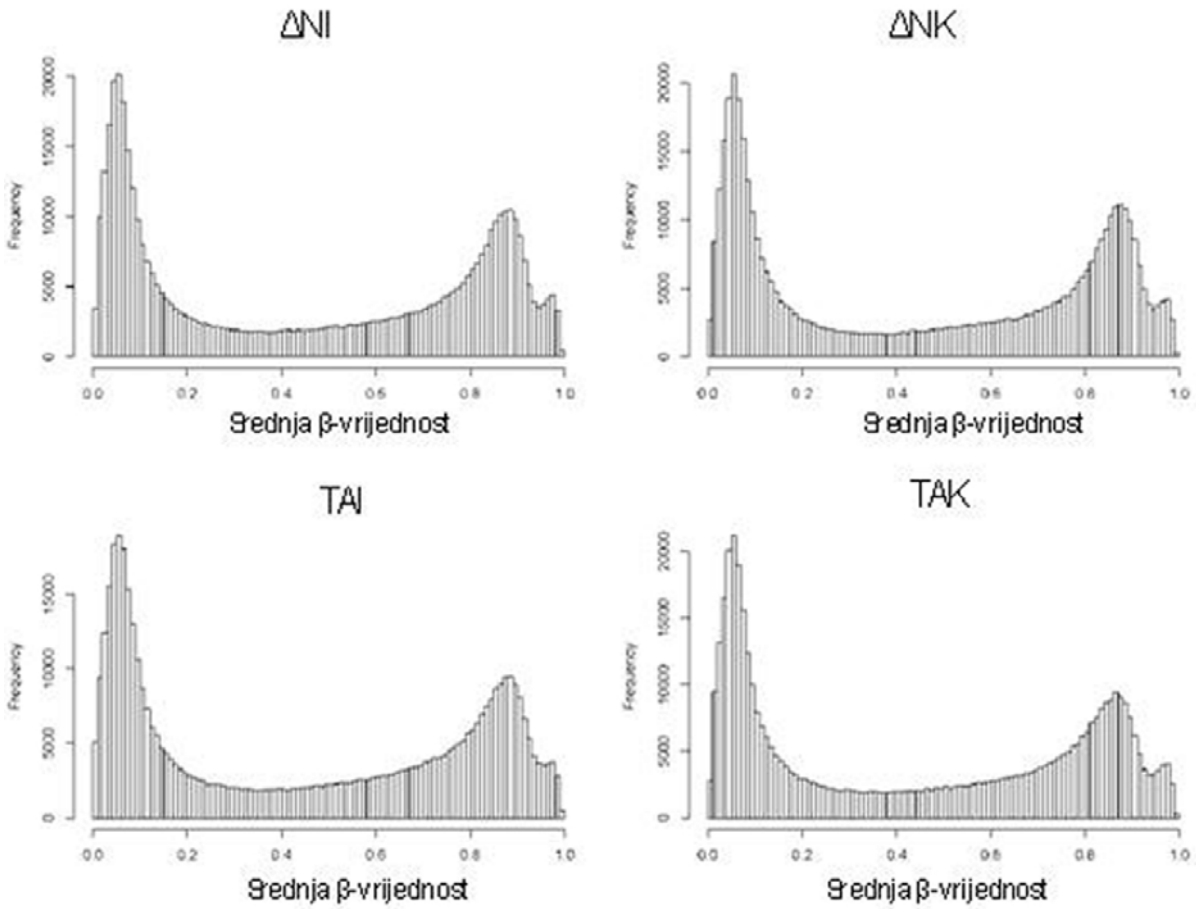
TAI i ΔNI predstavljaju uzorke staničnih linija inducirane doksiciklinom, a TAK i ΔNK njihove kontrole, za svaki od tri pojedinačna pokusa.

Visoka međusobna korelacija između svih parova uzoraka (Pearsonova korelacija > 95%) ukazuje na tehničku ispravnost postupka odnosno kvalitetu podataka. Podatci su standardizirani određivanjem β-vrijednosti za svaki pojedini lokus. β-vrijednost predstavlja standardizirani omjer metiliranih nasuprot zbroju metiliranih i nemetiliranih signala, odnosno omjer broja metiliranih citozina nasuprot ukupnom zbroju metiliranih i nemetiliranih citozina na pojedinom lokusu.

Izračunata je kao srednja vrijednost sva tri pojedinačna mjerenja, te prikazana tablično za čitav genom pojedinog uzorka:

β-vrijednost lokusa = broj metiliranih citozina/zbroj nemetiliranih i metiliranih citozina

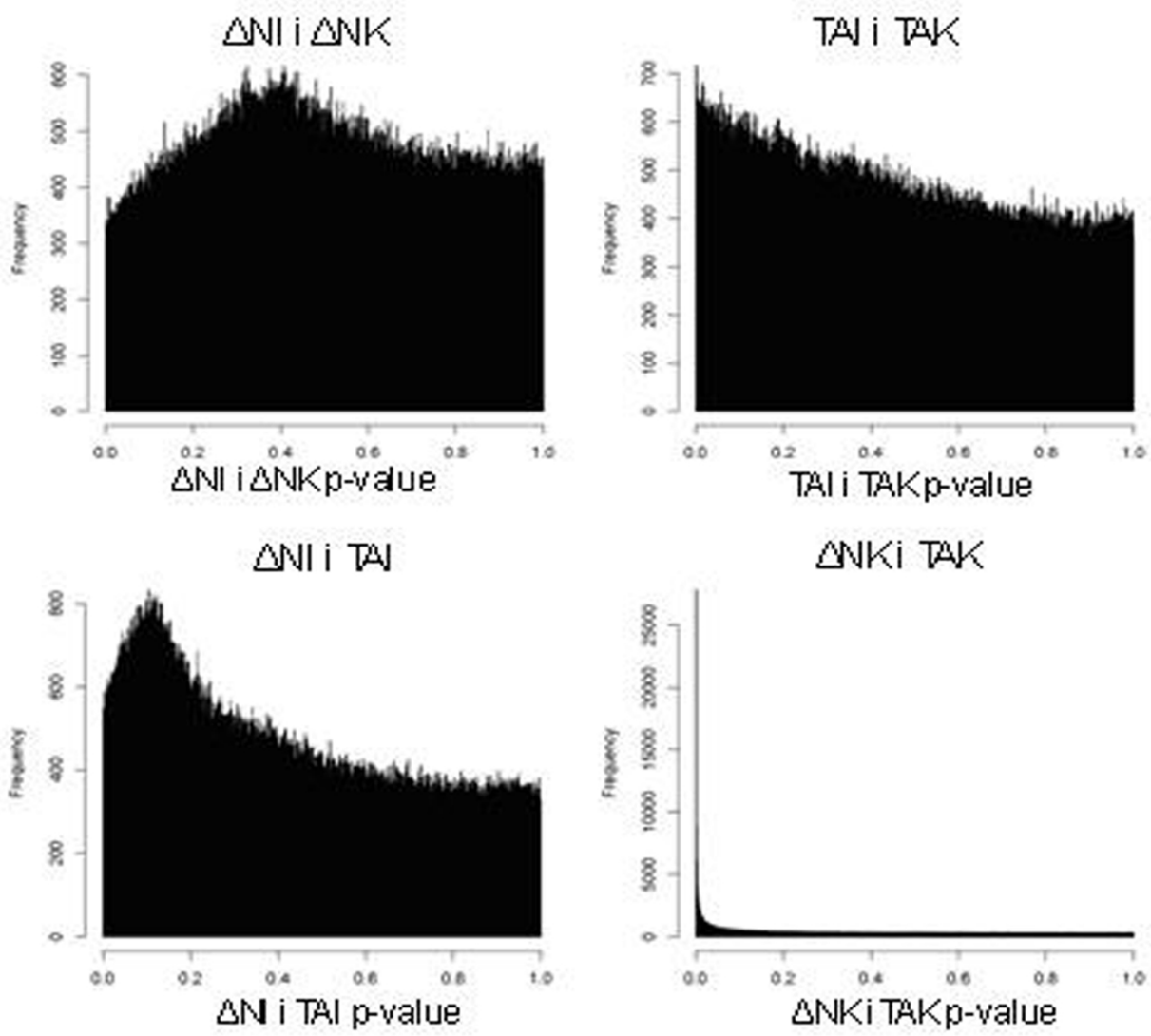
Histogram usporedbe srednjih β-vrijednosti pojedinih uzoraka pokazuje očekivanu raspodjelu metiliranih i nemetiliranih citozina (slika 7). U svim uzorcima zapažena je gotovo identična raspodjela frekvencija metiliranih odnosno nemetiliranih citozina: značajno veća frekvencija lokusa s niskim β-vrijednostima (do 0,2), odnosno onih kod kojih je broj metiliranih citozina malen u odnosu na ukupan zbroj metiliranih i nemetiliranih citozina na tom lokusu. Frekvencija lokusa pri rasponu β-vrijednosti 0,2-0,7 je mala, te ponovno veća frekvencija lokusa s višim β-vrijednostima (iznad 0,7), ali potonjih ipak duplo niža u odnosu na frekvenciju lokusa sa nižim β-vrijednostima (za β 0,1 frekvencija oko 20 000, dok je za β 0,9 oko 10 000).



Slika 7. *Histogram frekvencije β-vrijednosti metilacije za pojedine uzorke*

ΔNI označava srednje β-vrijednosti uzoraka s eksprimiranom izoformom ΔNp73, ΔNK srednje β-vrijednosti njihove kontrole. Također, TAI označava srednje β-vrijednosti uzoraka s eksprimiranom izoformom TAp73α, a TAK srednje β-vrijednosti njihove kontrole

Nakon što smo utvrdili metilacijski status za svaki pojedini uzorak stanica (ΔNI, ΔNK, TAI i TAK) usporedili smo pojedine uzorke međusobno sa ciljem da pokušamo utvrditi različito metilirane lokuse za svaki CpG pojedinačno (ukupno oko 480 000), odnosno složenije strukture kao što su otoci CpG (približno njih 28 000), te otoci CpG povezani s promotorskim regijama (oko 18 000). Za svaki par uzoraka urađen je t-test. Histogrami p-vrijednosti za četiri usporedbe (ΔNI i ΔNK, ΔNI i TAI, TAI i TAK, te ΔNK i TAK) pokazuju da je najznačajnija razlika metiliranosti opažena u uzorcima između kontrolnih staničnih linija, dakle staničnih linija u kojima nisu inducirane izoforme p73 antibiotikom doksiciklinom (ΔNK i TAK) (slika 8).



Slika 8. *Histogrami p-vrijednosti pojedinih usporedbi*

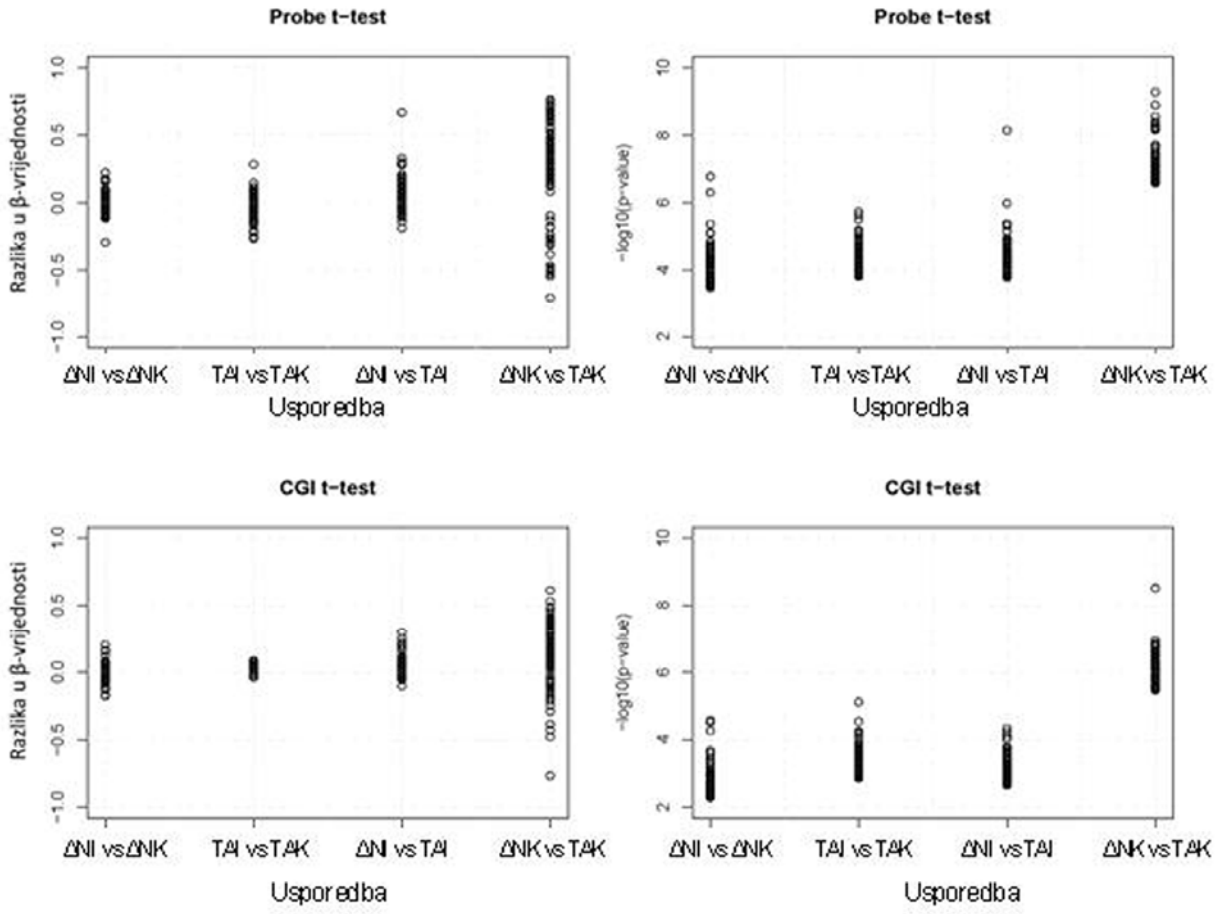
Međusobna usporedba metiliranosti pojedinih lokusa za svaki uzorak stanica (ΔNI uzorci s eksprimiranom izoformom ΔNp73, ΔNK njihova kontrola; TAI uzorci sa eksprimiranom izoformom TAp73, a TAK njihova kontrola).

β-vrijednosti pojedinačnih uzoraka uspoređene su međusobno (ΔNI s ΔNK, TAI s TAK, ΔNI s TAI, te ΔNK s TAK). Uspoređujući ukupno 39 170 lokusa za svaki uzorak stanica međusobno, statistički značajnu razliku u tako promatranoj metiliranosti genoma pronašli smo samo u usporedbi staničnih uzoraka prije indukcije izoformi p73 (ΔNK i TAK).

Tako je uz fdr < 0,1 (*false discovery rate*), razlika u metilaciji tih dvaju uzoraka pronađena na ukupno 12 091 lokusu, odnosno uz kriterij fdr < 0,05 na 8 715 lokusa.

Iz naših rezultata usporedbe metiliranosti genoma stanica SaOS2 prije i nakon aktivacije pojedine izoforme gena p73 (TAp73α i ΔNp73) vidimo da se nakon aktivacije metiliranost staničnog genoma nije mijenjala. Niti u jednoj usporedbi metiliranosti genoma stanica nakon aktivacije pojedine izoforme s njihovim kontrolama, nismo pronašli statistički značajnu razliku niti na jednom lokusu.

Taj smo rezultat potvrdili uspoređujući raspodjelu prosječnih razlika β-vrijednosti u pojedinim usporedbama i odgovarajućih p-vrijednosti između 100 statistički najznačajnijih razlika u svakoj usporedbi (slika 9).



Slika 9. *Usporedba razine metilacije CpG slijedova (CGI t-test)*

Prvo je izračunata β-vrijednost za svaki CpG slijed u pojedinom uzorku, te potom uspoređeni pojedini uzorci (ΔNI uzorci sa eksprimiranom izoformom ΔNp73α, ΔNK njihova kontrola; TAI uzorci sa eksprimiranom izoformom TAp73α, a TAK njihova kontrola)

Razlike u usporedbi ΔNK i TAK statistički su značajnije nego one u preostale tri usporedbe. Slične rezultate možemo opaziti uspoređujući razinu metilacije otoka CpG (slika 9, prikaz 4- drugi stupac). U tom slučaju izračunali smo prosječnu β-vrijednost za svaki slijed CpG unutar pojedinog uzorka, a potom usporedili različite tipove uzoraka.

S obzirom da nismo pronašli statistički značajnu razliku u metiliranosti genoma nakon aktivacije pojedine izoforme gena, usporedili smo međusobnu razliku metiliranosti genoma

kontrolnih stanica, odnosno staničnih linija prije nego što su inducirane pojedine izoforme gena *TP73*.

U tablici 6. prikazano je 20 lokusa koji pokazuju statistički najveću razliku metiliranosti u usporedbi kontrolnih stanica (ΔNK i TAK). Nadalje, u tablici 7. prikazane su prosječne vrijednosti metiliranosti istih 20 lokusa (ΔNK i TAK), zatim broj citozinskih baza koji je analiziran na svakom od tih lokusa (nC), te je statistički izračunata p-vrijednost.

Tablica 6. *Lokusi s najizražajnijom razlikom metiliranosti između kontrolnih stanica.*

U tablici je prikazano 20 lokusa s najvećom razlikom u metiliranosti kontrolnih stanica, te naziv gena kojem taj lokus pripada

NAZIV GENA	**SIMBOL GENA**	**POLOŽAJ SLIJEDA CpG**
NA	*NA*	chr1:45965586-45966049
C1q and tumor necrosis factor related protein 1	*C1QTNF1*	chr17:77020023-77020868
family with sequence similarity 163, member A	*FAM163A*	chr1:179711947-179713951
family with sequence similarity 83, member B	*FAM83B*	chr6:54711153-54712033
prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide III	*P4HA3*	chr11:74022428-74022703
mutS homolog 5 (E. coli)	*MSH5*	chr6:31707489-31708336

NAZIV GENA	**SIMBOL GENA**	**POLOŽAJ SLIJEDA CpG**
CDC42 binding protein kinase gamma D (DMPK-like)	*CDC42BPG*	chr11:64594521-64595266
sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2	*SORCS2*	chr4:7647755-7647960
PR domain containing 16	*PRDM16*	chr1:3157509-33158300
kinesin light chain 2	*KLC2*	chr11:66035216-66035447
tubulin folding cofactor D	*TBCD*	chr17:80819019-80819260
thromboxane A2 receptor	*TBXA2R*	chr19:3606371-3607270
phospholipase B domain containing 1	*PLBD1*	chr12:14720248-14721093
MORN repeat containing 1	*MORN1*	chr1:2266007-2266432
coiled-coil domain containing 33	*CCDC33*	chr15:74537809-74538114
TNFRSF1A-associated via death domain	*TRADD*	chr16:67195600-67195827
receptor accessory protein 6	*REEP6*	chr19:1495209-1495413
netrin 1	*NTN1*	chr17:9066152-9066388
ADAMTS-like 2	*ADAMTSL2*	chr9:136444127-136444604
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3	*SRGAP3*	chr3:9032257-9032519

***Tablica 7**. Prosječne β-vrijednosti metiliranosti C-baza za pojedine lokuse.*

Prikazana je prosječna β-vrijednost za ΔNK i TAK, te razlika njihovih prosječnih β-vrijednosti. nC predstavlja ukupan broj C-baza analiziranih na određenom lokusu.

SIMBOL GENA	ΔNK β-vrijednost	TAK β-vrijednost	ΔNK–TAK β-vrijednost	p-vrijednost	nC
NA	0,196	0,249	-0,053	3,08E+05	9
C1QTNF1	0,183	0,376	-0,192	7,70E+07	11
FAM163A	0,314	0,271	0,042	8,43E+07	23
FAM83B	0,334	0,580	-0,245	4,53E+07	12
P4HA3	0,608	0,510	0,098	3,48E+07	11
MSH5	0,338	0,294	0,044	3,57E+07	51
CDC42BPG	0,633	0,563	0,069	8,48E+07	5
SORCS2	0,532	0,352	0,179	4,89E+07	11
PRDM16	0,238	0,188	0,051	2,37E+07	14
KLC2	0,393	0,071	0,322	1,58E+07	8
TBCD	0,707	0,499	0,208	8,44E+07	7
TBXA2R	0,371	0,31	0,061	2,71E+07	14
PLBD1	0,738	0,512	0,226	6,91E+07	15
MORN1	0,344	0,457	-0,113	1,43E+07	22
CCDC33	0,434	0,588	-0,153	2,60E+07	8
TRADD	0,226	0,078	0,147	2,90E+06	7

SIMBOL GENA	ΔNK β-vrijednost	TAK β-vrijednost	ΔNK–TAK β-vrijednost	p-vrijednost	nC
REEP6	0,152	0,538	-0,386	1,52E+07	3
NTN1	0,85	0,319	0,53	8,21E+05	7
ADAMTSL2	0,477	0,237	0,239	7,73E+07	1
SRGAP3	0,566	0,391	0,174	4,56E+07	6

4.3 Usporedba dobivenih rezultata metiliranosti genoma s rezultatima genske ekspresije dobivenih tehnikom mikročipova

Dobivene rezultate metiliranosti genoma stanica SaOS2 nakon indukcije izoforme ΔNp73 usporedili smo s rezultatima genske ekspresije dobivene tehnikom mikročipova (Kartasheva i sur., 2003). U navedenom radu, na staničnim linijama H1299 (nemaju eksprimiran gen *TP53*) inducirana je ekspresija izoforme ΔNp73α te su rezultati uspoređeni s kontrolnom skupinom u kojoj nije bilo ekspresije te izoforme. Značajna je promjena- pojačana, odnosno smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu, nađena u više od 30 gena (promjena razine mRNA). Kako su na taj način prikazani geni u stanicama H1299 koji svoju aktivnost, odnosno razinu ekspresije mijenjaju ovisno o aktivnosti izoforme gena ΔNp73α, mi smo željeli te rezultate povezati s našim rezultatima analize metiliranosti genoma stanica SaOS2 nakon aktivacije izoforme gena ΔNp73α, te utvrditi možemo li promjenu ekspresije pojedinih gena u radu Kartasheve i sur. dovesti u vezu s metilacijskim profilom istih gena u našem pokusu.

U tablici 8. prikazani su geni u radu Kartasheve i sur. koji pokazuju promjenu ekspresije gena nakon aktivacije ΔNp73α, a koje smo mogli identificirati u našim stanicama te očitati razinu metilacije. Prikazani geni su poredani prema njihovom stupnju promjene ekspresije, prikazane kao logaritamski omjer promjene ekspresije, pri čemu pozitivne vrijednosti označavaju pojačanu, a negativne smanjenu ekspresiju.

Tablica 8. Geni s promijenjenom ekspresijom nakon aktivacije ΔNp73α.

(*iz:Kartasheva i sur. (2003): ΔNp73 can modulate the expression of various genes in a p53 independent fashion. Oncogene 22:8246-8254). Prikazani su geni prema promjeni ekspresije. Pozitivne vrijednosti prikazuju indukciju, a negativne potiskivanje ekspresije gena. S.d. je standardna devijacija od četiri nezavisna eksperimenta.*

SIMBOL GENA	NAZIV GENA	$\log_2$	s.d.
EGR1	*early growth response 1*	2,74	0,92
ODC1	*ornithine decarboxylase 1*	-2,68	0,46
UAP1	*UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1*	-2,59	0,24
FOSL1	*FOS-like antigen 1*	-2,54	0,57
CSRP2	*cysteine and glycine-rich protein 2*	2,52	0,21
PRAME	*preferentially expressed antigen in melanoma*	2,32	0,10
AKAP1	*A kinase (PRKA) anchor protein 1*	-2,12	0,27
CDC6	*cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)*	1,85	0,29
GCH1	*GTP cyclohydrolase 1*	1,79	0,67
MPHOSPH10	*M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)*	-1,76	0,43
PTPRCAP	*protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein*	-1,72	0,60
CCNA2	*cyclin A2*	-1,71	0,66
F2R	*coagulation factor II (thrombin) receptor*	-1,67	0,34
NFKB1	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*	-1,64	0,64
TCEA1	*transcription elongation factor A (SII), 1*	-1,54	0,18

SIMBOL GENA	***NAZIV GENA***	**log_2**	**s.d.**
GOLPH3	*golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)*	-1,5	0,43
SIAH2	*seven in absentia homolog 2 (Drosophila)*	-1,5	0,52
CARS	*cysteinyl-tRNA synthetase*	-1,5	0,33

Ukupno 18 gena iz tablice 8. koji su pokazali značajnu promjenu ekspresije (pojačanu ili smanjenu) identificirali smo u našem pokusu u uzorku stanica SaOS2 . Gene smo izdvojili i prikazali tablično njihove β-vrijednosti metiliranosti u uzorku s aktiviranom izoformom ΔNp73α (ΔNI) te kontrolnom uzorku (ΔNK), i razliku u metiliranosti gena između pojedinih uzoraka (ΔNI-ΔNK). Statistički je izračunata p-vrijednost (tablica 9).

Tablica 9. *Metilacijski profil gena stanica SaOS2 nakon aktivacije izoforme ΔNp73α*

Prosječne β-vrijednosti metiliranosti gena u uzorku s induciranom izoformom ΔNp73α (ΔNI) i njihovoj kontroli (ΔNK).

SIMBOL GENA	NAZIV GENA	β-vrijednost			p-vrijednost
		ΔNI	ΔNK	ΔNI-ΔNK	
CCNA2	*cyclin A2*	0,0955	0,1070	-0,0116	0,086
CDC6	*cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)*	0,0875	0,0895	-0,002	0,830
EGR1	*early growth response 1*	0,1613	0,1636	-0,0023	0,404
ODC1	*ornithine decarboxylase 1*	0,1712	0,1663	0,0049	0,721
UAP1	*UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1*	0,1745	0,1716	0,0029	0,753
FOSL1	*FOS-like antigen 1*	0,7246	0,7005	0,0240	0,512
CSRP2	*cysteine and glycine-rich protein 2*	0,0958	0,0977	-0,0019	0,918
PRAME	*preferentially expressed antigen in melanoma*	0,1533	0,1546	-0,0013	0,687
AKAP1	*A kinase (PRKA) anchor protein 1*	0,1689	0,1696	-0,0007	0,648
GCH1	*GTP cyclohydrolase 1*	0,1695	0,1703	-0,0009	0,916
MPHOSPH10	*M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)*	0,1036	0,1051	-0,0015	0,727
PTPRCAP	*protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein*	0,8648	0,8670	-0,0048	0,632
F2R	*coagulation factor II (thrombin) receptor*	0,5120	0,5119	8,62E+08	0,999
NFKB1	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*	0,1490	0,1534	-0,0044	0,632
TCEA1	*transcription elongation factor A (SII), 1*	0,1927	0,2053	-0,0126	0,161
GOLPH3	*golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)*	0,1461	0,1483	-0,0022	0,867
SIAH2	*seven in absentia homolog 2 (Drosophila)*	0,1620	0,1611	0,0009	0,920
CARS	*cysteinyl-tRNA synthetase*	0,1875	0,1783	0,0093	0,287

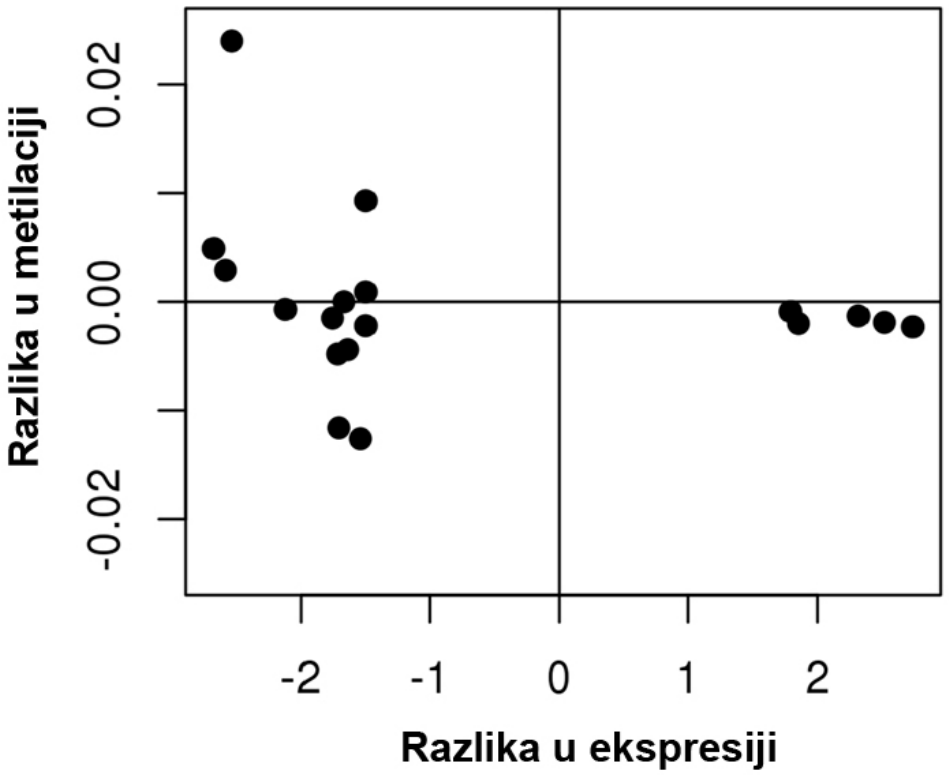
Potom smo za iste gene usporedili razlike njihove metiliranosti u stanicama s induciranom izoformomm ΔNp73α (ΔNI) i kontrolnim stanicama (ΔNK) izražene kao β-vrijednost, s logaritamskim vrijednostima promjene njihove ekspresije iz rada Kartasheve i sur. (tablica 10).

Tablica 10. *Usporedba promjena metiliranosti ciljnih gena nakon indukcije ΔNp73α s promjenom ekspresije istih gena nakon aktivacije ΔNp73α.*

Prikazane su razike β-vrijednosti metiliranosti pojedinih gena u našem pokusu te logaritamske vrijednosti promjene njihove ekspresije iz rada Kartasheve i suradnika nakon indukcije ΔNp73α.

SIMBOL GENA	**NAZIV GENA**	**ΔNI-ΔNK β-vrijednost**	**$\log_2$**
CCNA2	*cyclin A2*	-0,0116	2,74
CDC6	*cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)*	-0,002	-2,68
EGR1	*early growth response 1*	-0,0023	-2,59
ODC1	*ornithine decarboxylase 1*	0,0049	-2,54
UAP1	*UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1*	0,0029	2,52
FOSL1	*FOS-like antigen 1*	0,0240	2,32
CSRP2	*cysteine and glycine-rich protein 2*	-0,0019	-2,12
PRAME	*preferentially expressed antigen in melanoma*	-0,0013	1,85
AKAP1	*A kinase (PRKA) anchor protein 1*	-0,0007	1,79
GCH1	*GTP cyclohydrolase 1*	-0,0009	-1,76
MPHOSPH10	*M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)*	-0,0015	-1,72
PTPRCAP	*protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein*	-0,0048	-1,71
F2R	*coagulation factor II (thrombin) receptor*	8,62E+08	-1,67
NFKB1	*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*	-0,0044	-1,64
TCEA1	*transcription elongation factor A (SII), 1*	-0,0126	-1,54
GOLPH3	*golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)*	-0,0022	-1,5
SIAH2	*seven in absentia homolog 2 (Drosophila)*	0,0009	-1,5
CARS	*cysteinyl-tRNA synthetase*	0,0093	-1,5

Na slici 10. grafički je prikazan odnos promjene ekspresije gena iz rada Kartasheve i sur., te promjene njihove metiliranosti koju smo našli u našem radu. Iz prikaza se vidi da je za gene koji pokazuju pojačanu ekspresiju ΔNp73α, došlo do smanjene metiliranosti, iako statistički ne značajno. Kod gena koji su pokazali smanjenu ekspresiju nakon aktivacije ΔNp73α, nismo našli tako jednoznačnu povezanost, odnosno u našem radu za tu skupinu gena nismo mogli dokazati očekivano povećanje razine metiliranosti.



Slika 10. *Usporedba promjena u ekspresiji gena s promjenama u metilaciji otoka CpG nakon indukcije izoforme ΔNp73α.*

Dobivene rezultate promjene metiliranosti genoma nakon indukcije izoformi *p73* iz našeg pokusa usporedili smo i s podatcima i za drugu izoformu – TAp73α. Tako smo naše podatke usporedili s rezultatima promjene transkripcijskog odgovora gena nakon vezivanja izoformi TAp73α i TAp73β u genomu (Koeppel i sur., 2011). U navedenom radu ispitivana su globalna vezna mjesta za izoforme TAp73α i TAp73β unutar genoma na staničnim linijama MDA-MB231, HCT116, HEK293 i SAOS2. Nakon globalnog detektiranja njihovih veznih mjesta, u nastavku je analiziran transkripcijski odgovor genoma na vezivanje izoformi sekvencioniranjem RNA (*RNA-seq*). Pokazalo se da se obje izoforme vežu na zajednička, ali i izoformno specifična ciljna mjesta, te imaju različit utjecaj na ciljne gene. Uzeli smo podatke za izoformu TAp73α, te analizirali promjenu ekspresije gena nakon vezivanja izoforme na njeno vezno mjesto. Izdvojili smo 20 gena koji su pokazali najizraženiju promjenu ekspresije, te ih prikazali poredane prema njihovom stupnju promjene ekspresije, prikazane kao logaritamski omjer promjene, pri čemu pozitivne vrijednosti označavaju pojačanu, a negativne smanjenu ekspresiju (tablica 11).

Podatci su dostupni u Gene Expression Omnibus (GEO) bazi podataka pod pristupnim brojem GSE 15 780 (Barrett i sur., 2009), na adresi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE15780.

Tablica 11. Geni s najznačajnije promijenjenom ekspresijom nakon aktivacije TAp73α

(iz: Koeppel i sur. (2011): Crosstalk between c-Jun and TAp73α/β contributes to the apoptosis-survival balance. Nucleic Acid Research 39:6069-6085).

SIMBOL GENA	**NAZIV GENA**	**log_2**
BACE2	*beta-site APP-cleaving enzyme 2*	-8
SFN	*stratifin*	7,79
CYYR1	*cysteine/tyrosine-rich 1*	-7,73
DPYSL4	*dihydropyrimidinase-like 4*	-7,48
EMB	*embigin*	-7,25
MIER2	*mesoderm induction early response 1, family member 2*	-6,98
SLC8A3	*solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3*	-6,87
NRXN1	*neurexin 1*	-6,82
NPTX2	*neuronal pentraxin II*	-6,75
RARRES2	*retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2*	6,52
TP73	*tumor protein p73*	6,47
ZNF682	*zinc finger protein 682*	-6,3
IL17RA	*interleukin 17 receptor A*	-6,21
C3orf54	*chromosome 3 open reading frame 54*	6,13
PLD5	*phospholipase D family, member 5*	-5,91
EMID2	*EMI domain containing 2*	-5,7
NIPAL4	*NIPA-like domain containing 4*	5,64
THEM4	*thioesterase superfamily member 4*	-5,58
ICAM1	*intercellular adhesion molecule 1*	5,55
PARP11	*poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11*	-5,55

Potom smo 20 gena iz tablice 11. s najizraženijom promjenom ekspresije iz rada Koeppel i suradnika identificirali u našem pokusu. Gene smo izdvojili i prikazali tablično njihove β-vrijednosti metilacije u uzorku s aktiviranom izoformom TAp73α (TAI), te kontrolnom uzorku (TAK), kao i razliku β-vrijednosti njihove metiliranosti u navedenim uzorcima (TAI-TAK). Statistički smo izračunali p-vrijednost (tablica 12).

Tablica 12. *Metilacijski profil gena stanica SaOS2 nakon aktivacije izoforme TAp73α*

Prosječne β-vrijednosti metiliranosti gena u stanicama sa induciranom izoformom TAp73α (TAI) i stanicama u kojima ista izoforma nije eksprimirana (TAK).

SIMBOL GENA	NAZIV GENA	β-vrijednost			p-vrijednost
		TAI	TAK	TAI-TAK	
BACE2	*beta-site APP-cleaving enzyme 2*	0,190	0,213	-0,023	0,307
SFN	*stratifin*	0,777	0,775	0,002	0,869
CYYR1	*cysteine/tyrosine-rich 1*	0,153	0,160	-0,007	0,573
DPYSL4	*dihydropyrimidinase-like 4*	0,280	0,286	-0,005	0,156
EMB	*embigin*	0,262	0,269	-0,007	0,704
MIER2	*mesoderm induction early response 1, family member 2*	0,877	0,897	-0,020	0,295
SLC8A3	*solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3*	0,224	0,234	-0,010	0,293
NRXN1	*neurexin 1*	0,302	0,282	0,020	0,559
NPTX2	*neuronal pentraxin II*	0,343	0,353	-0,009	0,279
RARRES2	*retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2*	0,468	0,461	0,007	0,657
TP73	*tumor protein p73*	0,218	0,223	-0,005	0,008
ZNF682	*zinc finger protein 682*	0,408	0,466	-0,058	0,294
IL17RA	*interleukin 17 receptor A*	0,683	0,644	0,038	0,438
C3orf54	*chromosome 3 open reading frame 54*	0,079	0,084	-0,005	0,671
PLD5	*phospholipase D family, member 5*	0,284	0,332	-0,047	0,395
EMID2	*EMI domain containing 2*	0,602	0,601	0,001	0,891
NIPAL4	*NIPA-like domain containing 4*	0,544	0,533	0,010	0,309
THEM4	*thioesterase superfamily member 4*	0,495	0,498	-0,003	0,766
ICAM1	*intercellular adhesion molecule 1*	0,577	0,589	-0,011	0,442
PARP11	*poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11*	0,514	0,492	0,021	0,497

U nastavku smo za iste gene usporedili razlike β-vrijednosti njihove metiliranosti između stanica s induciranom izoformom TAp73α (TAI) i kontrolnih stanica (TAK), s logaritamskim vrijednostima promjene njihove ekspresije iz rada Koeppela i sur. (tablica 13).

Tablica 13. *Usporedba promjene metiliranosti ciljnih gena nakon indukcije TAp73α s promjenom ekspresije istih gena nakon aktivacije TAp73α.*

Prikazane su razlike β-vrijednosti metiliranosti pojedinih gena u našem pokusu nakon indukcije izoforme TAp73α (TAI-TAK), te logaritamske vrijednosti promjene njihove ekspresije iz rada Koeppel i suradnika.

SIMBOL GENA	**NAZIV GENA**	**TAI-TAK β-vrijednost**	**log_2**
BACE2	*beta-site APP-cleaving enzyme 2*	-0,023	-8
SFN	*stratifin*	0,002	7,79
CYYR1	*cysteine/tyrosine-rich 1*	-0,007	-7,73
DPYSL4	*dihydropyrimidinase-like 4*	-0,005	-7,48
EMB	*embigin*	-0,007	-7,25
MIER2	*mesoderm induction early response 1, family member 2*	-0,020	-6,98
SLC8A3	*solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3*	-0,010	-6,87
NRXN1	*neurexin 1*	0,020	-6,82
NPTX2	*neuronal pentraxin II*	-0,009	-6,75
RARRES2	*retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2*	0,007	6,52
TP73	*tumor protein p73*	-0,005	6,47
ZNF682	*zinc finger protein 682*	-0,058	-6,3
IL17RA	*interleukin 17 receptor A*	0,038	-6,21
C3orf54	*chromosome 3 open reading frame 54*	-0,005	6,13
PLD5	*phospholipase D family, member 5*	-0,047	-5,91
EMID2	*EMI domain containing 2*	0,001	-5,7
NIPAL4	*NIPA-like domain containing 4*	0,010	5,64
THEM4	*thioesterase superfamily member 4*	-0,003	-5,58
ICAM1	*intercellular adhesion molecule 1*	-0,011	5,55
PARP11	*poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11*	0,021	-5,55

Na slici 11. grafički je prikazan odnos promjene ekspresije gena iz rada Koeppela i sur., te promjene njihove metiliranosti koju smo istražili u našem radu. Kao što je navedeno, u našem radu nismo pronašli statistički značajnu razliku u metiliranosti genoma nakon indukcije izoforme TAp73α. Uspoređujući istovremeno rezultate promjene ekspresije za navedenih 20 gena s promjenama metiliranosti tih istih gena u našem pokusu, našli smo u samo šest gena obrazac kojim bi mogli objasniti promjenu genske ekspresije s promjenama metiliranosti, pri čemu smo za tri gena koja pokazuju pojačanu ekspresiju nakon aktivacije TAp73α u našem radu našli smanjenu metiliranost, te također za tri gena koji pokazuju smanjenje ekspresije – povećanje metiliranosti u našem pokusu. Uspoređujući podatke za ostalih 16 gena nismo našli promjenu metiliranosti u našem radu koja bi se mogla dovesti u vezu sa promjenom njihove ekspresije nađene u radu Koeppela i suradnika.



Slika 11. *Usporedba promjena u ekspresiji gena s promjenama u metilaciji otoka CpG nakon indukcije izoforme TAp73α.*

5. RASPRAVA

Metiliranje DNA je dinamičan, reverzibilan način epigenetske regulacije kojim se nakon replikacije dodaju metilne skupine na citozinske ostatke (najčešće slijed CpG), te se tako može mijenjati funkcionalnost brojnih gena u stanici. Promjene obrazaca metiliranosti DNA uobičajene su u stanicama raka. Istovremeno s hipermetiliranošću otoka CpG u stanicama raka dolazi do globalne hipometiliranosti genoma (Jones i sur., 2002) .

Obrasci metiliranja DNA u stanicama čovjeka najviše su vezani uz otoke CpG, područja relativno veće gustoće parova baza CpG koji su smješteni na 5´ kraju većine gena (Bird, 2002). U prvim eksperimetnima koji su sekvencirali ljudski genom predviđeno je postojanje približno 29 000 CpG otoka (Landerer i sur., 2001; Venter i sur., 2001).

Većina otoka CpG u stanicama čovjeka ostaje nemetilirana u svim tipovima tkiva. Budući da su mnogi otoci CpG smješteni unutar gena koji su utišani zbog tkivne specifičnosti, slijedi da otoci CpG mogu ostati nemetilirani iako je njihov gen utišan. Suprotno, tijekom razvoja organizma, kao i u nekim slučajevima (upisani geni, utišavanje X-kromosoma) može doći do metiliranja pojedinih otoka CpG, i tada promotor gena povezan s metiliranim otocima ostaje utišan (Bird, 2002). Danas postoje jasni dokazi da *de novo* metilacija može nastati i u odraslim somatskim stanicama. Značajan dio svih otoka CpG ljudskih gena u nekim tkivima sklon je progresivnom metiliranju tijekom starenja ili u abnormalnim stanicama kao što su stanice raka (Issa, 2000; Baylin i Herman, 2000). Nakupljanje metiliranih CpG u somatskim stanicama teče vrlo sporo, npr. za *de novo* metiliranje provirusa u stanicama eritroleukemije miša potrebno je nekoliko tjedana (Lorincz i sur., 2000). Slično tome, oporavak globalno metilirane DNA nakon uzastopnog tretiranja mišjih stanica inhibitorom metilacije DNA (5-azacytidin) traje mjesecima (Flatau i sur., 1984).

Smatra se da je metiliranost gena odgovornih za programiranu staničnu smrt odgovorna za malignu transformaciju. Metiliranost gena *TP73* nađena je u određenim tipovima raka, kao u nekim tipovima leukemija i limfoma (u NK stanicama frekvencija metiliranosti je čak 94%), te u neuroblastomima i karcinomu pluća (Pluta i sur., 2006; Siu i sur., 2002; Casciano i sur., 2002; Di Vinci i sur., 2009). U akutnoj limfoblastičnoj leukemiji (ALL) metilacija gena *p73* je česta i smatra se da bi metilacijski status p73 mogao biti značajan u prognozi bolesti (Pluta i sur., 2006).

U neuroblastomima je nađena različita metiliranost promotora P1 i P2 (Casciano i sur, 2002.), P1 nije metiliran, dok je P2 metiliran u svim tumorima koji nemaju eksprimiran ΔNp73, a djelomično i u tumorima s visokom ekspresijom ΔNp73. Dakle, ekspresiju ΔNp73, barem djelimično kontroliraju epigenetički događaji. U tumorima pluća nađena je pojačana ekspresija obje izoforme – i TAp73 i ΔNp73, P1 nije metiliran u većini tumora, a P2 je metiliran samo u 50% tumora, iz čega proizlazi da nema korelacije između metiliranosti promotora i ekspresije pojedine izoforme gena (Di Vinci i sur., 2009). To se može objasniti činjenicom da protutijela kojima se određuje ΔNp73 detektiraju i translacijski produkt ΔN'p73 čija transkripcija ide s promotora P1 i čija je ekspresija u tumorima visoka (Concin i sur, 2004; Moll i Slade, 2004). Nasuprot, kvanitativan *real time PCR* omogućuje točniju detekciju eksprimiranih izoformi. Nadalje, kvalitativne metode za određivanje metilacije (metoda PCR specifičan za metilaciju, *methylation specific PCR*, kojom se koriste početni nukleotidi specifični za metilirane, odnosno nemetilirane oblike promotora staničnih gena) nisu tako precizne kao novije metode, koje koriste sofisticirane uređaje, tzv. *next generation sequencing,* kakve smo i mi koristili u svojem istraživanju. Korištenje ovakovih uređaja omogućuje određivanje metilacije u kliničkim uzorcima s vrlo malom količinom DNA (Shaw i sur., 2006).

Na tragu studije Di Vinci i suradnika, nedavno je dokazano da je u nemikrocelularnom karcinomu pluća promotor P1 rijetko hipermetiliran (što bi smanjilo razinu ekspresije TAp73), a promotor P2 je često hipometiliran, što je povezano s pojačanom ekspresijom ΔNp73 (Daskalos i sur., 2011). Za usporedbu, u nomalnim tkivima pluća promotor P2 je pojačano metiliran, a P1 nemetiliran (Di Vinci i sur., 2009). Hipometiliranost P2 povezana je sa globalnom hipometiliranošću genoma (određivana preko metilacije promotora LINE-1, surogat markera za globalnu hipometiliranost). Dakle, globalna hipometiliranost DNA mogla bi imati za posljedicu pojačanu ekspresiju ΔNp73 u tumorima. Sveukupno, navedeni podatci ukazuju da u raku pluća epigenetske promjene mogu biti presudne za deregulaciju aktivnosti P2, dok je deregulacija P1 određena transkripcijskim događajima (Daskalos i sur, 2011). Tako je ekspresija ΔNp73 pod epigenetičkom kontrolom u normalnim stanicama pluća. Kada se P2 deregulira, dolazi do pojačane transkripcije protu-apoptotske izoforme ΔNp73. S druge stane, epigenetska kontrola je slabija u slučaju P1 i sinteza odgovarajuće izoforme ovisi o specifičnim transkripcijskim faktorima. Dakle, različit način regulacije P1 i P2 promotora predstavlja slobodu u sintezi odgovarajućih izoformi, dozvoljavajući na taj način njihovu različitu ulogu. Ova studija podržava

stav da izoforme TAp73 i ΔNp73 imaju različite, jedinstvene, a ne suprotne funkcije. Daljnja istraživanja rasvjetlit će dodatno odnose ovih dviju izoformi.

U studijama koje su istraživale utjecaj TAp73α, odnosno ΔNp73α na ekspresijski profil (Fontemaggi i sur., 2002; Kartasheva i sur., 2003.) nađeno je da TAp73α potiče transkripciju gena koji se samo djelomično preklapaju s onima koje potiče p53 (Fontemaggi i sur., 2002.), a ΔNp73α mijenja ekspresiju mnogih gena na koje p53 i TAp73α ne djeluju. Dakle, ΔNp73α funkcionira neovisno o p53 kao regulator vlastitih ciljnih gena (Kartasheva i sur., 2003). Studija Koeppel i suradnika (2011) istraživala je, međuostalim, i ekspresijski profil u inducibilnoj staničnoj linijii SaOS2 nakon inducirane ekspresije TAp73α, odnosno TAp73β i p53. Našli su da TAp73α i TAp73β, dvije srodne izoforme ali s ne potpuno istom funkcijom u staničnim procesima, reguliraju ekspresiju istih gena, ali i različitih, kao i nekih istih gena koje regulira p53 (TAp73α/TAp73β/p53).

Do sada nije u potpunosti razjašnjeno kako p73 utječe na metiliranost genoma. Štoviše, budući da isti gen kodira za nekoliko izoformi s različitim funkcijama, ispitivanje utjecaja pojedine izoforme gena *TP73* na globalnu metiliranost staničnog genoma od izuzetnog je značaja. Promjene obrasca metiliranja, koje najčešće nastupaju u neoplastičnim stanicama predstavljaju jedan od mehanizama inaktivacije gena. Posebice metiliranje gena koji sudjeluju u procesu apoptoze predstavlja važan korak u zloćudnoj transformaciji stanice (Pluta i sur., 2006). Dosadašnja istraživanja pokazala su da gubitak funkcionalnosti gena *TP53,* srodnika gena *TP73*, rezultira oslobađanjem potiskivanja te značajnim povećanjem ekspresije DNMT1 i na razini RNA i proteina (Peterson i sur., 2003). To je bio prvi dokaz da bi poremećaj signalnog puta p53 mogao biti odgovoran za pojačanu ekspresiju DNMT1. Gubitak jednog alela *TP53* dovodi do transformacije praćene metilacijom otoka CpG tumor supresorskih gena *MGMT*, *TIPM3*, *p16INK4a* te globalne hipometilacije (Taylor, 2006). Dakle, haploinsuficijencija je dovoljna za početak metilacije povezane s utišavanjem tumor supresorskih gena u tumorima ljudi. Gubitak drugog alela vodi dramatičnoj deregulaciji metilacije DNA i brojnim metiliranim otočićima CpG. Nadalje, uz regulaciju ekspresije DNMT1, nekoliko studija pokazalo je fizičku interakciju između p53 i DNA metiltransferaza, te između p53 i histonskih deacetilaza. Te interakcije su značajne za inaktivaciju nekih gena koji sudjeluju npr. u potiskivanju apoptoze (Taylor, 2006). Nadalje, male promjene razine ekspresije p53 mogu imati značajan utjecaj na stabilnost metiliranosti DNA, posebice ako se gleda u kontekstu modifikacije DNA metiltransferaza.

Na metilaciju DNA tako indirektno utječe i mutirani oblik p53 kao i oštećenja uzvodnog signalnog puta p53. No, usprkos tome, smatra se da su i poremećaj komponenti signalnog puta p53 i poremećaj epigenetičke modifikacije genoma, koji su sveprisutni u stanicama raka, rani događaji u procesu neoplastične transformacije (Taylor, 2006).

U našem radu smo koristeći metodu *Illumina Human Methylation BeadChip* utvrdili metilacijski status otoka CpG u inducibilnoj staničnoj liniji ljudskog osteosarkoma (SaOS2) u kojima je ekspresija izoformi p73, TAp73α i ΔNp73α pod kontrolom tetraciklinskog promotora. Ustanovili smo metilacijski status ukupno 39 170 otoka CpG vezanih za pojedine gene, koji čine područja važna za funkcionalnu aktivnost tih gena.

Uspoređujući β-vrijednosti (omjer broja metiliranih citozina nasuprot ukupnom zbroju metiliranih i nemetiliranih citozina na pojedinom lokusu) u induciranim stanicama s njihovim kontrolama, odnosno stanicama SaOS2 prije indukcije odgovarajuće izoforme, u našem radu nismo pronašli statistički značajne razlike metilacijskog statusa.

U pojedinim mjerenjima dobivena je razlika (ukupno su za svaku izoformu rađena tri nezavisna eksperimenta, te su dobiveni rezultati računati kao srednja vrijednost), što ukazuje na premda malu, ali ipak promjenu u metilaciji citozina otoka CpG. Međutim, kada smo izračunali srednju vrijednost za svaki otok, te rezultate usporedili s neinduciranim kontrolama, nismo dobili statistički značajnu razliku. Iz navedenog proizlazi da aktivacija pojedine izoforme, ΔNp73α, odnosno TAp73α, ne utječe na metilacijski profil stanice.

To se može dijelom objasniti činjenicom da smo koristili stanice tumora, osteosarkoma, kojima je metilacijski status već karakterističan za određeni tumor, te na koji dodatna ekspresija izoformi ΔNp73α i TAp73α zbog toga nema značajniji utjecaj. Premda je očekivani utjecaj indukcije TAp73α kočenje rasta stanica, iz navedenog možemo zaključiti da u našem pokusu nismo pronašli dokaze koji bi potkrijepili pretpostavku da je mehanizam koji dovodi do promjene ekspresije staničnih gena u ovom slučaju promjena metilacije.

Nakon što smo iz dobivenih rezultata zaključili da promjena ekspresije pojedinih izoformi p*73* nema značajnijeg utjecaja na metiliranost gena u stanicama osteosarkoma čovjeka, usporedili smo dobivene rezultate sa rezultatima studija u kojima su uspoređivali utjecaj aktivacije pojedinih izoformi gena *TP73* na ekspresijski profil stanica, koji bi mogao biti posredovan i metilacijom. Za usporedbu smo uzeli rezultate studije Kartasheve i sur. (2002), te Koeppela i sur. (2011).

U prvoj je analiziran utjecaj izoforme ΔNp73α na ekspresijski profil staničnih linija H1299 koje nemaju eksprimiran p53 (*TP53*$^{-/-}$). U navedenom radu tehnikom mikročipova istražen je utjecaj pojačane ekspresije izoforme ΔNp73α na ciljne gene, a u odsutnosti p53. Nađeno je da je ekspresija 30 gena značajno (trostruko) promijenjena nakon indukcije ΔNp73α u odnosu na kontrolu. Utjecaj ΔNp73α na regulaciju ekspresije tih gena razlikuje od utjecaja drugih izoformi p73 te od p53. Autori zaključuju da ΔNp73α može regulirati ekpresiju različitih gena neovisno o p53.

U studiji Koeppela i suradnika (2011) određena su globalna vezna mjesta za TAp73α i TAp73β, a potom je sekvenciranjem RNA provedena globalna ekspresijska analiza na nekoliko tumorskih staničnih linija ljudi, te na istoj inducibilnoj staničnoj liniji SaOS2 (p53, TAp73α ili TAp73β). Pokazalo se da se dvije izoforme TAp73 vežu i na zajednička, kao i na ciljna mjesta specifična za izoformu, što je u skladu s njihovim različitim fiziološkim odgovorom. Autori su našli statistički značajnu promjena ekspresije 5466 gena nakon vezivanja izoforme TAp73α na njena vezna mjesta u genomu (Q-vrijednost manja od 0,001).

Iz dosad navedenog, proizlazi da bi mehanizam promjene ekspresije gena mogao uključivati metiliranje, pri čemu bi pojačana metiliranost gena u području njihovih promotora rezultirala smanjenom ekspresijom navedenih gena, i suprotno, smanjena metiliranost promotora dovela bi do pojačane ekspresije gena. Stoga smo usporedili naše rezultate s rezultatima navedenih radova, sa ciljem da pokušamo povezati promjene ekspresije pojedinih gena s našim, iako ne statistički značajnim, ali ipak mjerljivim promjenama metiliranosti promotora tih istih gena. Od tridesetak gena navedenih u studiji Kartasheve i suradnika, za osamnaest gena smo našli promjenu metiliranosti u našem radu. Nakon što smo usporedili promjenu razine metiliranosti za svaki navedeni gen u našem radu-kao razliku metiliranosti uzorka nakon aktivacije izoforme ΔNp73α, te kontrole u kojoj izoforma ΔNp73α nije aktivna, nismo uspjeli pronaći statistički značajnu razliku promjene obrasca metiliranosti koja bi se jasno mogla dovesti u vezu sa promjenom ekspresije istih gena nakon aktivacije izoforme ΔNp73α.

Također, analizirajući podatke iz rada Koeppela i sur., od ukupno dvadeset gena koji su pokazali najveću promjenu ekspresije nakon aktivacije izoforme TAp73α, za svega šest gena smo pronašli očekivani metilacijski status u našem pokusu-tri gena sa smanjenim ekspresijskim odgovorom bila su pojačano metilirana u našim istraživanjima, a tri gena s pojačanim

ekspresijskim odgovorom iz rada Koeppela i suradnika u našem su pokusu ostala hipometilirana nakon indukcije TAp73α.

Dakle, analizirajući podatke iz našeg pokusa, i uspoređujući ih sa podatcima iz literature, nismo uspjeli pronaći jasnih dokaza da bi smanjenje metiliranosti gena bio dominantni mehanizam kojim izoforme TAp73 i ΔNp73 kontroliraju ekspresiju gena.

Objašnjenje bi moglo biti u činjenici da metilacija nije jedini epigenetički obrazac kojim se može mijenjati ekspresija gena u stanicama, te je moguće da je promjena ekspresije navedenih gena nastupila kao posljedica drugih epigenetičkih zbivanja nakon aktivacija određene izoforme gena *p73*. Takav zaključak slaže se s podatcima iz literature koji ukazuju na različit fiziološki učinak dviju izoformi gena p73-TAp73 i ΔNp73, ali molekularni mehanizam koji bi objasnio različit stanični odgovor na aktivaciju ovih izoformi još uvijek je nejasan (Klanrit i sur., 2008). Također, budući da se radi o različitim vrstama stanica, moguće je da su navedeni geni pod utjecajem drugih proteina koji onemogućavaju značajniju promjenu metiliranosti.

Ipak, uspoređujući pojedinačno navedene gene iz rada Kartasheve i suradnika za koje smo našli promjenjenu metilaciju u našim stanicama, možemo primijetiti da smo u svih pet gena koji su pojačano eksprimirani nakon aktivacije ΔNp73α (*EGR1, CSRP2, PRAME, CDC6, GCH 1)* pronašli smanjenu metiliranost nakon aktivacije ΔNp73α u odnosu na stanice u kojima nije induciran. Premda ta razlika nije statistički značajna, ipak ukazuje da bi smanjenje metiliranosti mogao biti dijelom mehanizam kojim ΔNp73α utječe na pojačanu ekspresiju ciljnih gena. Od trinaest gena u kojih je razina ekspresija gena snižena, mi smo u njih šest našli pojačanu metiliranost, dok je u ostalih sedam ona bila snižena nakon aktivacije ΔNp73α.

Dakle, metilacijski profil CpG otoka unutar gena stanica SaOS2 ne pokazuje statistički značajnu promjenu nakon aktivacije pojedinih izoformi *TP73* niti za jedan gen. Međutim, u našem pokusu korištene su komercijalne stanice u koje je nezavino unešen plazmid za inducibilnu ekspresiju željenih gena (ΔNK i TAK), i u kojima je prije aktivacije izoformi ΔNp73α i TAp73α pronađena značajna razlika metiliranosti i to u ukupno 12 091 otoka CpG. Kao što je ranije navedeno, nakon aktivacije pojedine izoforme, te usporedbe svake sa svojom kontrolom (inicijalnim uzorkom), razlika u metiliranosti genoma nije nađena. Ali, usporedbom stanica nakon indukcije izoformi međusobno također nije nađena statistički značajna razlika u metiliranosti genoma.

Kako smo u uzorcima prije indukcije izoformi pronašli statistički značajnu razliku u metiliranosti spomenutih 12 091 otoka CpG, a u statističkoj usporedbi istih uzoraka nakon indukcije pojedinih izoformi ista razlika nije nađena, vjerojatno je da je ipak došlo do promjene metiliranosti genoma u uzorcima nakon indukcije, međutim, ta je promjena bila na oba uzorka u vrlo malim brojevima sa suprotnim predznacima, tako da nakon statističke obrade i izračunavanja srednje vrijednosti triju mjerenja nije bila statistički značajna.

6. ZAKLJUČCI

1. Dokazali smo da je metoda *Illumina HumanMethylation450 BeadChip* podesna za brzo određivanje metilacijskog statusa velikog broja (~480 000) CpG mjesta.
2. Našom analizom pokazali smo stanje metiliranosti ukupno 39 170 otoka CpG vezanih uz promotorske regije gena unutar stanica SaOS2, kao i promjene metiliranosti koje nastaju aktiviranjem izoformi TAp73α i ΔNp73α.
3. Nismo pronašli statistički značajan utjecaj pojačane ekspresije TAp73α i ΔNp73α na metiliranost promotorskih regija u genomu stanica SaOS2.
4. Usporedbom s rezultatima genske ekspresije, dokazali smo da postoji povezanost pojačane ekspresije pojedinih gena nakon aktivacije izoforme ΔNp73α sa smanjenom metiliranošću otoka CpG u promotorskim regijama genoma, premda ta povezanost nije statistički značajna.
5. Za gene koji pokazuju smanjenu razinu ekspresije nakon aktivacije ΔNp73α nismo uspjeli potvrditi istovremeno očekivano povećanje razine metiliranosti otoka CpG u promotorskim regijama, iz čega možemo zaključiti da bi smanjenje ekspresije gena nakon aktivacije ΔNp73α moglo biti posljedica djelovanja drugih epigenetičkih mehanizama.
6. Uspoređujući naše rezultate sa rezultatima promjene genske ekspresije nakon aktivacije TAp73α, nismo uspjeli dokazati povezanost promijenjene metiliranosti otoka CpG u promotorskim regijama gena s promjenom njihove ekspresije, što također ukazuje da bi promjena ekspresijskog odgovora nakon aktivacije TAp73 mogla biti posredovana drugim epigenetičkim mehanizmima.

7. LITERATURA

1. Agirre X., Vizmanos JL., Calasnz MJ., Garcia-Delgado M., Larrayoz MJ., Novo FJ. (2003): Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP 53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. Oncogene 22: 1070-1072.
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson JD. (1994): Molecular biology of the cell. 3. izd. New York: Garland Publishing Inc.
3. Allegrucci C. i sur. (2007): Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. Hum Mol Genet 16:1253-1268.
4. Antequera F., Bird A. (1993): Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proc Natl Acad Sci 90: 11995-11999.
5. Banerjee T. i Chakravarti D. (2011): A peek into the complex realm of histone phosphorylation. Mol Cell Biol 31: 4858-4873.
6. Bannister AJ., Kouzarides T. (2004): Histone methylation: recognizing the methyl mark. Methods Enzymol 376: 269-288.
7. Barrett T., Troup DB., Wilhite SE., Ledoux P., Rudnev D., Evangelista C., Kim IF., Soboleva A., Tomashevsky M., Marshall KA., Phillippy KH., Sherman PM., Muertter RN., Edgar R. (2009): NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. Nucleic Acids Res 37: D885-D890.
8. Baylin SB., Herman JG. (2000): DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. Trends Genet 16: 168-174.
9. Baylin SB., Herman JG., Graff JR., Vertino PM., Issa JP. (1998): Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res 72: 141-196.
10. Becker K., Pancoska P., Concin N., Vanden Heuvel K., Slade N., Fischer M., Chalas E., Moll UM. (2006): Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynaecological cancer. Int J Onc 29: 889-902.

11. Bénard J., Douc-Rasy S., Ahomadegbe JC. (2003): TP53 family members and human cancers. Hum Mutat 21: 182-191.

12. Bibikova M., Barnes B., Tsan C., Ho V., Klotzle B., Le JM., Delano D., Zhang L., Schroth GP., Gunderson KL., Fan JB., Shen R. (2011): High density DNA methylation array with single CpG site resolution. Genomics 98: 288-295.

13. Bird A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16: 6-21.

14. Bird AP. (1987): CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. Trends Genet 3: 342-347.

15. Bourdon JC., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas DP., Saville MK., Lane DP. (2005): p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev 19: 2122-2137.

16. Bradbury J. (2003): Human Epigenome Project- Up and Running. PloS Biol 1: 316-319.

17. Casciano I., Mazzocco K., Boni L., Pagnan G., Banelli B., Allemanni G., Ponzoni M., Tonini GP., Romani M. (2002): Expression of ΔNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. Cell Death Differ 9: 246-251.

18. Concin N., Becker K., Slade N., Erster S., Mueller-Holzner E., Ulmer H., Daxenbichler G., Zeimet A., Zeillinger R., Marth C., Moll UM. (2004): transdominant ΔTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. Cancer Res 64: 2449-2460.

19. Concin N., Hofstetter G., Berger A., Gehmacher A., Reimer D., Watrowski R., Tong D., Shuster E., Hefler L., Heim K., Mueller- Holzner E., Marth C., Moll UM., Zeimet AG., Zeillinger R. (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.

20. Daniel JA., Pray-Grant MG., Grant PA. (2005): Effector proteins for methylated histones: an expanding family. Cell Cycle 4: 919-926.

21. Daskalos A., Logotheti S., Markopoulou S., Xinarianos G., Gosney JR., Kastania AN., Zoumpourlis V., Field JK., Liloglou T. (2011): Global DNA hypomethylation-induced ΔNp73 transcriptional activation in non-small cell lung cancer. Cancer Letters 300: 79-86.

22. De Laurenzi V., Raschella G., Barcaroli D et al. (2000): Induction of neuronal differentiation by p73 in neuroblastoma cell line. J Biol Chem 275: 15226-15231.

23. Deneberg S. (2012): Epigenetics in myeloid malignancies. Methods Mol Biol 863: 119-137.

24. De Smet C., Lurquin C., Lethe B., Martelange V., Boon T. (1999): DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor- specific genes with a CpG-rich promoter. Mol Cell Biol 19: 7327-7335.

25. Deyoung MP., Ellisen LW. (2007): p63 and p73 in human cancer: Defining the network. Oncogene 26: 5169-5183.

26. Di Vinci A., Sessa F., Casciano I., Banelli B., Franzi F., Brigati C., Allemanni G., Russo P., Dominioni L., Romani M. (2009): Different intracellular compartmentalization of TA and ΔNp73 in non-small cell lung cancer. Int J Oncol 34: 449-456.

27. Duenas-Gonzales A., Lizano M., Candelaria M., Cetina L., Arce C., Cervera E. (2005): Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. Mol Cancer 4:38-61.

28. Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones PA. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 429: 457-463.

29. Esteller M. (2005): Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 629-656.

30. Esteller M. (2006): The necessity of a human epigeniome project. Carcinogenesis 27: 1121-1125.

31. Esteller M. i Herman JG. (2002): Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. J Pathol 196: 1-7.

32. Flatau E., Gonzales FA., Michalowsky LA., Jones PA. (1984): DNA methylation in 5-Aza-2´-deoxycytidine-resistant variants of C3H 10T1/2 C18 cells. Moll Cell Biol 4: 2098-2102.

33. Fontemaggi G., Kela I., Amariglio N., Rechavi G., Krishnamurthy J., Strano S., Sacchi A., Givol D., Blandino G. (2002): Identification of direct p73 target genes combining DNA microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. J Biol Chem 277: 43359-43368.

34. Gall Trošelj K., Novak Kujundžić R., Grbeša I. (2009): Epigenetika i fiziologija gena. Medicina 45: 127-135.

35. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. (2004): Regulation of human p53 activity and cell localisation by alternative splicing. Mol Cell Biol 24: 7987-7997.

36. Herman JG., Graff JR., Myöhänen S., Nelkin BD., Baylin SB. (1996): Methylation - specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9821-9826.

37. Hofstetter G., Berger A., Fiegl H., Slade N., Zorić A., Holzer B., Schuster E., Mobus VJ., Reimer D., Daxenbichler G., Marth C., Zeimet AG., Concin N., Zeillinger R. (2010): Alternative splicing of p53 and p73: the novel p53 splice variant p53Δ is an independent prognostic marker in ovarian cancer. Oncogene 29: 1997-2004.

38. Howell CY., Bestor TH., Ding F., Latham KE., Mertineit C., Trasler JM., Chaillet JR. (2001): Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. Cell 104: 829-838.

39. Ichimiya S., Nimura Y., Kageyama H., Takada N., Sunahara M., Shishikura T., Nakamura Y., Sakiyama S., Seki N., Ohira M., Kaneko Y., McKeon F., Caput D., Nakagawara A. (1999): p73 at chromosome 1p36.3 is lost in advanced stage neuroblastoma but its mutation is infrequent. Oncogene 18: 1061-1066.

40. Imyanitov EN., Birrell GW., Fillipovich I., Sorokina N., Arnold J., Mould MA., Wright K., Walsh M., Mok SC., Lavin MF., Chenevix-Trench G., Khanna KK. (1999): Frequent loss of heterozygosity at 1p36 in ovarian adenocarcinomas but the gene encoding p73 is unlikely to be the target. Oncogene 18: 4640-4642.

41. Ishimoto O., Kawahara C., Enjo K, Obinata M., Nukiwa T., Ikawa S. (2002): Possible oncogenic potential of ΔNp73: a newly identified isoform of human p73. Cancer Res 62: 636-641.

42. Issa JP. (2000): CpG- island methylation in aging and cancer. Curr Top Microbiol Immunol 249: 101-118.

43. Jablonka E and Lamb MJ. (2002): The Changing Concept of Epigenetics. Annals of the New York Academy of Sciences 981: 82-96.

44. Jain N., Rossi A., Garcia-Manero G. (2009): Epigenetic therapy of leukemia. An update. Int J Biochem Cell Biol 41: 72-80.

45. Jenuwein T. and Allis CD. (2001): Translating the histone code. Science 293: 1047-1080.

46. Jones PA., Baylin SB. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet 3: 514-528.

47. Jones PA., Laird PW. (1999): Cancer epigenetics comes of age. Nature Genet 21:163-167.

48. Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan JC., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J.M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F., Caput D. (1997): Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell 90: 809-819.

49. Kaneda A., Kaminishi M., Ushijima T. (2004): Decreased expression of the seven ARP 2/3 complex genes in human gastric cancers. Cancer Lett 212: 203-210.

50. Kartasheva NN., Contente A., Lenz-Stöppler C., Roth J., Dobbelstein M. (2002): p53 induces the expression of its antagonist p73ΔN, establishing an autoregulatory feedback loop. Oncogene 21: 4715-4727.

51. Kartasheva NN., Lenz-Bauer C., Hartmann O., Schäfer H., Eilers M., Dobbelstein M. (2003): ΔNp73 can modulate the expression of various genes in a p53 – independent fashion. Oncogene 22: 8246-8254.

52. Klanrit P., Flinterman MB., Odell EW., Melino G., Killick R., Norris JS., Tavassoli M. (2008): Specific isoforms of p73 control the induction of cell death induced by the viral proteins, E1A or apoptin. Cell Cycle 7: 205-215.

53. Koeppel M., Van Heeringen SJ., Kramer D., Smeenk L., Janssen-Megens E., Hartmann M., Stunnenberg HG., Lohrum M. (2011): Crosstalk between c-Jun and TAp73α/β contributes to the apoptosis-survival balance. Nucleic Acids Res 39: 6069-6085.

54. Kovalev S., Marchenko N., Swendeman S., LaQuaglia M., Moll UM. (1998): Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. Cell Growth Differ 9: 897-903.

55. Labar B. (2001): Molekularna genetika- budućnost onkologije. Medicus 10: 141-145.

56. Laird, PW. (2003): The power and the promise of DNA methylation markers. Nature Rev Cancer 3: 253-266.

57. Laird PW. (2005): Cancer epigenetics. Hum Mol Genet. 14: 65-76.

58. Laird, PW. (2010): Principles and challanges of genomewide DNA methylation analysis. Nat Rev Genet 11: 191-209.

59. Landerer ES., Linton LM., Birren B., Nusbaum C., Zody MC., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., i sur. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921.

60. Lane DP. i Crawford LV.(1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 278: 261-263.

61. Levine AJ. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88: 323-331.

62. 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.

63. Liu G., Nozell S., Xiao H., Chen X. (2004): ΔNp73β is active in transactivation and growth suppresion. Moll Cell Biol 24: 487-501.

64. Lomeli H. i Vazquez M. (2011): Emerging roles of the SUMO pathway in development . Cell Mol Life Sci 68: 4045-4064.

65. Lorincz MC., Schubeler D., Goeke SC., Walters M., Groudine M., Martin DIK. (2000): Dynamic analysis of proviral induction and de novo methylation: Implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression. Moll Cell Biol 20: 842-850.

66. Meier M., den Boer ML., Meijerink JP. I sur. (2006): Differential expression of p73 isoforms in relation to drug resistance in childhood Tlineage acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia 20: 1337-1384.

67. Melino G., De Laurenzi V., Voudsen KH. (2002): p73: friend or foe in tumorigenesis. Nat Rev Cancer 2: 605-615.

68. Moll UM., Slade N.(2004): p63 and p73: Roles in development and tumor formation. Mol Cancer Res 2: 371-386.

69. Nomoto S., Haruki N., Kondo M., Konishi H., Takahashi T. (1998): Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. Cancer Res 58: 1380-1383.

70. Okano M., Bell DW., Haber DA., Li E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development. Cell 99: 247-257.

71. Omura N. i sur. (2008): Genome-wide profilling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Biol Ther 7: 1146-1156.

72. Oswald C., Stiewe T. (2008): In good times and bad: p73 in cancer. Cell Cycle 7: 1726-1731.

73. Peterson EJ., Bogler O., Taylor SM. (2003): p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. Cancer Res 63: 6579-6582.

74. Pluta A., Nyman U., Joseph B., Robak T., Zhivotovsky B., Smolewski P. (2006): The role of p73 in hematological malignancies. Leukemia 20: 757-766.

75. Pomraning KR., Smith KM., Freitag M. (2009): Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. Methods 47: 142-150.

76. 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.

77. Pruitt KD., Tatusova T., Brown GR., Maglott DR. (2012): NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. Nucl Acids Res 40: D130-D135.

78. Rakyan VK., Down TA., Balding DJ., Beck S. (2011): Epigenome- wide association studies for common human diseases. Nat Rev Genet 12: 529-541.

79. Rhead B., Karolchik D., kuhn RM., Hinrichs AS., Zweig AS., Fujita PA., Diekhans M., Smith KE., Rosenbloom KR., Raney BJ., Pohl A., Pheasant M., Meyer LR., Learned K., Hsu F., i sur. (2010): The UCSC genome browser database: update 2010. Nucleic Acids Res 38: D613-D619.

80. Rosenbluth JM., Pietenpol JA. (2008): The jury is in: p73 is a tumor suppressor after all. Genes Dev 22: 2591-2595.

81. Sandoval J., Heyn H., Moran S., Serra-Musach J., Pujana MA., Bibikova M., Esteller M. (2011): Validation of DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. Epigenetics 6: 692-702.

82. Schones DE. i Zhao K. (2008): Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. Nature Rev Genet 9: 179-191.

83. Scoumanne A. and Chen X. (2008): Protein methylation: a new regulator of the p53 tumor supressor. Histol Histopathol 23: 1143-1149.

84. Scoumanne A., Harms KL., Chen X. (2005): Structural basis for gene activation by p53 family members. Canc Biol Ther 4: 1178-1185.

85. Shaw R.J., Akufo-Tetteh E.K., Risk J.M., Field J.K., Liloglou T. (2006): Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing, Nucleic Acids Res 34: e78.

86. Shilatifard A. (2006): Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. Annu Rev Biochem 75: 243-269.

87. Siu LL., Chan JK., Wong KF., Kwong YL., (2002): Specific patterns of gene methylation in natural killer lymphomas: p73 is consistenly involved. Am J Pathol 160: 59-66.

88. 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.

89. Sneider TW. (1980): The 5`-cytosine in CCGG1 is methylated in two eukaryotic DNAs and Msp I is sensitive to methylation at this site. Nucleic Acids Res 8: 3829-3840.

90. Sorić J. (1996): Molekularna biologija tumora. U: Turić M., Kolarić K., Eljuga D.: Klinička onkologija. Nakladni zavod globus, Zagreb.

91. Stiewe T., Theseling CC, Putzer BM. (2002): Transactivation-deficient ΔTA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. J Biol Chem 277: 14177-14185.

92. Sun XF. (2002): p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 8: 165-170.

93. Takai D., Jones PA. (2002): Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci 99: 3740-3745.

94. Taylor S.M. (2006) p53 and deregulation of DNA methylation in cancer. Cellscience Reviews 2.

95. Tomasini R., Tsuchihara K., Wilhelm M., Fujitani M., Rufini A., Cheung C., Khan F., Itie-Youten A., Wakeham A., Tsao MS., Iovanna JL., Squire J., Jurisica I., Kaplan D., Melino G., Jurisicova A., Mak TW. (2008): TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor supressor functions. Genes Dev 2: 2677-2691.

96. Torre L., Lopez-Rodas G., Latasa MU., Carretero MV., Boukaba A., Rodriguez JL., Franco L., Mato JM., Avila MA. (2000): DNA methylation and histone acetylation of rat methionine adenosyltranferase 1A and 2A genes is tissue-specific. Int J Biochem Cell Biol 32: 397-404.

97. Tost J., Gut IG. (2007): Analysis of gene – specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology. Methods Mol Biol 373: 89-102.

98. Tschan MP., Grob TJ., Peters UR et al. (2000): Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. Biochem Biophys Res Commun 277: 62-65.

99. Venter JC., Adams MD., Myers EW., Li PW., Mural RJ., Sutton GG., Smith HO., Yandell M., Evans CA., Holt RA., i sur. (2001): The sequence of the human genome. Science 291: 1304-1351.

100. Vigna E., Recchia AG., Madeo A., Gentile M., Bossio S., Mazzone C., Lucia E., Morabito L., Gigliotti V., Stefano LD., Caruso N., Servillo P., Franzese S., Fimoghari F., Bisconte MG., Gentile C., Morabito F. (2011): Epigenetic regulation in myelodysplastic syndromes: implications for therapy. Expert Opin Investig Drugs 20: 465-493.

101. Weber M. i sur. (2005): Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nature Genet 37: 853-862.

102. Wilhelm MT., Rufini A., Wetzel MK., Tsuchihara K., Inoue S., Tomasini R., Itie-Youten A., Wakeham A., Arsenian-Henriksson M., melino G., Kaplan DR., Miller FD., Mak TW. (2010): Isoform- specific p73 knockout mice reveal a novel role for ΔNp73 in the DNA damage response pathway. Genes Dev 24: 549-560.

103. Wu G., Nomoto S., Hoque MO., Dracheva T., Osada M., Lee CC., Dong SM., Guo Z., Benoit N., Cohen Y. (2003): ΔNp63α and TAp63α regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. Cancer Res 63: 2351-2357.

104. Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Flemig MD., Doetsch V., Andrews NC., Caput D., McKeon F. (1998): p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. Moll Cell 2: 305-316.

105. Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Bronson RT. i sur. (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 398: 714-718.

106. Zaika AI., Slade N., Erster SH., Sansome C., Joseph TW., Pearl M., Chalas E., Moll UM. (2002): Delta Np73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. J Exp Med 196: 765-780.

107. Zhu Q. i Wani AA. (2010): Histone modifications: crucial elements for damage response and chromatin restoration. J Cell Physiol 223: 283-288.

108. Zorić A., Horvat A., Slade N. (2010): Obitelj gena p53- uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. Med Fluminens Vol 46, No 2: 135-145.

8. ŽIVOTOPIS

Neven Tučkar rođen je 28. ožujka 1967. godine u Zagrebu. Nakon završene osnovne i srednje škole u Zagrebu, upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu na kojem diplomira 1993. godine. Po završenom studiju, nakon obavljenog obaveznog liječničkog staža polaže stručni ispit, te potom radi u ambulantama opće medicine DZ Centar u Zagrebu. 1995. godine zapošljava se u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, gdje provodi godinu dana i stječe iskustva rada bolničkog liječnika. 1996. godine prelazi u Kliniku za ginekologiju i porodništvo KBC „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu i započinje specijalizaciju iz Ginekologije i opstetricije. Specijalistički ispit polaže 2001. godine i od tada do danas radi na mjestu liječnika specijalista iste Klinike. 2003. godine upisuje znanstveni poslijediplomski studij „Fiziologija i imunobiologija“ na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2007. godine polaže subspecijalistički ispit iz Fetalne medicine i opstetricije. Tijekom kliničkog staža pohađa nekoliko međunarodnih tečajeva- International basic and advanced course on Gynaecological endoscopic surgery (Ljubljana, Slovenija, 2002), The theoretical course for the certificate of Competence in Ultrasound Examination (Kings College, London, UK, 2006.), European Federation for Colposcopy and Pathology of LFGT Course (Krakow, Poland, 2009). Član je Hrvatskog liječničkog zbora, te više stručnih društava unutar Zbora, dugogodišnji je tajnik Hrvatskog društva za kolposkopiju i bolesti vrata maternice HLZ-a. Dobitnik je diplome HLZ za doprinos njegovanja časne tradicije HLZ, medicinske znanosti i zdravstva u RH (2009). Koautor je više znanstvenih i stručnih radova publiciranih u stručnoj medicinskoj literaturi, te poglavlja u knjizi. Aktivno i pasivno sudjeluje na više međunarodnih i domaćih stručnih skupova, te je dugogodišnji predavač stručnog predmeta Ginekologija u Srednjoj medicinskoj školi u Vinogradskoj u Zagrebu.