

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Veronika Gunjević

6736/BT

**GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI TUMOR SUPRESORSKOG
GENA *TP53* U MENINGEOMIMA**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biologija 2

Mentor: Dr.sc. Reno Hrašćan, izv.prof.

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

GUBITAK HETEROZIGOTNOSTI TUMOR SUPRESORSKOG GENA *TP53* U MENINGEOMIMA

Veronika Gunjević, 6736/BT

Sažetak: U ovom je radu proučavana učestalost pojave gubitka heterozigotnosti gena *TP53* kod osoba koje boluju od meningeoma. U tu svrhu, korištena metoda bila je analiza polimorfizma u duljini restrikcijskih fragmenata. Kao uzorak korištena je genomska DNA iz meningeoma i iz leukocita. Najprije je umnožen dio introna 6 gena *TP53* PCR-om iz uzoraka, a zatim je vršena restrikcija PCR produkta endonukleazom MspI. Rezultati su bili prikazani elektroforezom na agaroznom gelu. Samo je 21,05% pacijanata u ovom uzorku bilo informativno za ovaj genski marker. U niti jednog pacijenta nije pronađen gubitak heterozigotnosti. Međutim, pošto je uzorak heterozigotnih pacijenata malen, bilo bi dobro istražiti ovu pojavu na većem broju heterozigotnih pacijanata.

Ključne riječi: gen *TP53*, gubitak heterozigotnosti, intron 6, meningeom

Rad sadrži: 35 stranica, 10 slika, 4 tablice, 41 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Dr.sc. Reno Hrašćan, izv.prof.

Pomoć pri izradi: Dr.sc. Tomislav Vladušić, viši asistent

Rad predan: rujan 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

LOSS OF HETEROZYGOSITY OF TUMOR SUPPRESSOR GENE *TP53* IN MENINGIOMA

Veronika Gunjević, 6736/BT

Abstract: This paper studied the incidence of loss of heterozygosity of *TP53* gene in patients suffering from meningioma. For this purpose, the method used was the Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on samples of genomic DNA from meningioma and leukocytes. First, part of intron 6 of gene *TP53* was amplified by PCR, and then the restriction of PCR products was performed with MspI endonuclease. Results were obtained by electrophoresis on agarose gel. Only 21,05% of patients were informative for this genetic marker. No patient showed loss of heterozygosity. However, since the sample of heterozygous patients is small, it is necessary to investigate this occurrence on a larger number of heterozygous patients.

Keywords: gene *TP53*, loss of heterozygosity, intron 6, meningioma

Thesis contains: 35 pages, 10 figures, 4 tables, 41 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Dr.sc. Reno Hrašćan, Assoc.Prof.

Technical support and assistance: Dr.sc. Tomislav Vladušić, research assistant

Thesis delivered: September 2015

SADRŽAJ:

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1.TUMOR SUPRESORSKI GEN <i>TP53</i>	2
2.1.1.OTKRIĆE GENA <i>TP53</i>	2
2.1.2.POLOŽAJ GENA <i>TP53</i> NA KROMOSOMU	3
2.1.3.STRUKTURA GENA <i>TP53</i>	3
2.1.4.STRUKTURA PROTEINA p53	3
2.1.5. ALTERNATIVNI TRANSKRIPATI GENA <i>TP53</i>	4
2.1.6.KONTROLA FUNKCIJE p53 POMOĆU PROTEINA MDM2.....	5
2.1.7. ULOGA PROTEINA p53	6
2.1.7.1. ULOGA PROTEINA p53 U NESTRESNIM UVJETIMA	6
2.1.7.2. ULOGA PROTEINA p53 U STRESNIM UVJETIMA	8
2.2.MENINGEOMI	10
2.3.GENSKJE PROMJENE NA GENU <i>TP53</i>	12
2.3.1.NAJČEŠĆE GENSKJE PROMJENE NA GENU <i>TP53</i>	12
2.3.2.GENSKJE PROMJENE GENA <i>TP53</i> I NJIHOVA UČETALOST U RAZLIČITIM OBLICIMA TUMORA	14
2.3.3. PROMJENE U INTRONSKOJ REGIJI GENA <i>TP53</i> I NJIHOVA UČESTALOST U RAZLIČITIM OBLICIMA TUMORA	16
2.3.4.DRUGI NAČINI INAKTIVACIJE p53	17
2.4.PCR I NAČIN RESTRIKCIJE INTRONA 6 GENA <i>TP53</i> S RESTRIKCIJSKIM ENZIMOM <i>Msp I</i>	18
3.EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1.MATERIJALI I KEMIKALIJE ZA ANALIZU	21
3.1.1. DNA UZORCI.....	21
3.1.2.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA PCR.....	21
3.1.3.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA RESTRIKCIJU	21
3.1.4.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA ELEKTROFOREZU.....	21
3.1.4.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA BOJANJE GELA.....	22
3.2.LABORATORIJSKI PRIBOR I APARATURA	22
3.3.METODE ANALIZE	22
3.3.1.UMNAŽANJE DIJELA GENOMA PCR REAKCIJOM.....	22

3.3.2.RESTRIKCIJA	23
3.3.3.ELEKTROFOREZA.....	23
4.REZULTATI.....	24
5.RASPRAVA I ZAKLJUČAK.....	29
6.LITERATURA.....	30

1.UVOD

Geni koji zaustavljaju rast tumora nazivaju se tumor supresorskim genima, prigušivačima ili kočničarima raka. Ti geni djeluju kao antionkogeni i suprimiraju prekomjernu proliferaciju stanica. Jedan od njih je i gen *TP53*. Gen *TP53* još se naziva i čuvarom genoma, te je jedan od najvažnijih tumor supresorskih gena. Njegov produkt je protein p53 koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa. Pošto je gubitak funkcije gena *TP53* zabilježen u više od polovice ljudskih tumora, uloga ovog gena smatra se vrlo važnom u proučavanju nastanka tumora. Genske se promjene na *TP53* mogu naći i u eksonima i u intronima gena, utjecati na tumor supresorsku ulogu gena *TP53* te povećati mogućnost pojave tumora. U eksonima, genske promjene gotovo uvijek dovode do pojave tumora zbog nefunkcionalnog genskog produkta, tj. proteina p53. Najčešće se genske promjene zapravo nalaze u intronima, ali posljedice takvih promjena još uvijek su nepoznate i predmet su brojnih istraživanja. U ovom radu proučavana je učestalost gubitka heterozigotnosti (LOH, od eng. Loss of Heterozygosity) gena *TP53* kod meningeoma. Meningeomi su iznimno učestali tumori odraslih ljudi, a potječu od moždane ovojnice mozga i leđne moždine. Čine 15% svih tumora u središnjem živčanom sustavu. Iako se općenito smatraju benignim tumorima, meningeomi mogu prouzročiti ozbiljnu bolest zbog recidiva tumora. U pojedinim istraživanjima dokazano je kako su promjene u strukturi DNA introna 6 gena *TP53* česte kod tumora Li-Fraumeni spektra i raka jajnika. Međutim, za sad se jako malo zna o učestalosti promjena u strukturi DNA na intronu 6 kod meningeoma. U ovom radu za detekciju promjena u strukturi DNA na intronu 6 gena *TP53* korištena je analiza polimorfizma u duljini restrikcijskih fragmenata (RFLP, od eng. Restriction Fragment Length Polymorphism), pomoću restrikcijske endonukleaze MspI.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TUMOR SUPRESORSKI GEN *TP53*

Službeno ime ovog gena je „tumor protein p53“, a službeni simbol *TP53*. Također je poznat i kao *P53*, antigen *NY-CO-13*, *TRP53*, *P53* tumor supresor (NLM, 2015). Kodira za protein p53, koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa i djeluje kao tumor supresor. Ekspimiran je u svim tjelesnim stanicama, ali u većini tkiva na vrlo niskom nivou (Najman, 2002).

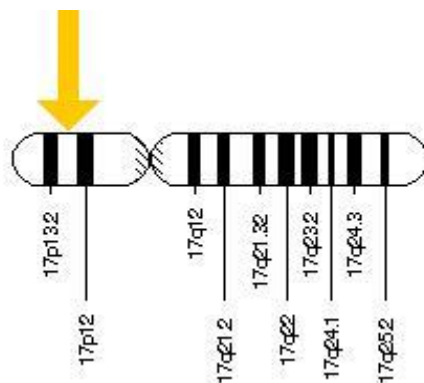
2.1.1. OTKRIĆE GENA *TP53*

Prve naznake o djelovanju tumor supresorskih gena dali su pokusi hibridizacije somatskih stanica 1969. godine. Fuzijom normalnih i tumorskih stanica nastale su hibridne stanice koje su sadržavale kromosome obiju staničnih linija. Takve hibridne stanice nisu, u većini slučajeva, mogle stvarati tumore u životinjama. Prema tome, činilo se da geni iz normalne ishodišne stanice suprimiraju nastanak tumora. Međutim, prepoznavanje ovih gena na molekularnoj razini omogućio je jedan drugi pristup – analiza rijetkih nasljednih oblika raka u ljudi. Do otkrića prvog tumorskog supresorskog gena dovela su istraživanja retinoblastoma, rijetkoga dječjeg tumora oka. Retinoblastom je nasljedna bolest te se zbog toga proučavao genom ispitanika. Godine 1971. postavljena je pretpostavka prema kojoj su za nastanak ove bolesti potrebne mutacije na oba alela gena odgovornog za nastanak retinoblastoma, koji je danas poznat kao tumor supresorski gen *Rb*. Istraživanja mapiranja gena pokazala su da tumor nastaje zbog gubitka normalnih alela *Rb* u tumorskim stanicama potvrdivši pretpostavku da *Rb* djeluje kao tumor supresorski gen. Molekularnim kloniranjem i izolacijom *Rb*, 1986. godine je nedvojbeno dokazano da u retinoblastomima *Rb* nedostaje ili je mutiran. Pokusi prijenosa gena pokazali su da stanice retinoblastoma, u koje je unesen normalan gen *Rb*, nisu sposobne stvarati tumore što je bio izravan dokaz da *Rb* djeluje kao tumorski supresor.

Drugi otkriveni tumor supresorski gen je *TP53* (Cooper i Hausman, 2010). Njegov produkt p53 identificiran je 1979. godine kao stanični protein koji ulazi u interakciju s onkogenim T antigenom virusa SV40 (Zorić i sur., 2010). Kasnije je p53 nađen u različitim transformiranim mišjim staničnim linijama,

kultiviranim humanim tumorskim stanicama i u mišjim tumorima induciranim kemijskim agensima, zračenjem ili virusima (Najman, 2002). Pošto je bio eksprimiran u mnogim tumorskim stanicama, smatrao se onkogenom. Veliku pažnju istraživača počeo je privlačiti tek 1989. godine, kad su po prvi put opisane genske promjene ovog gena kod ljudskih tumora (Stojanev i sur., 2010).

2.1.2. POLOŽAJ GENA *TP53* NA KROMOSOMU



Slika 1. Položaj gena *TP53* u genomu (NLM, 2015).

Gen *TP53* nalazi se na kratkom (p) kraku kromosoma 17 na položaju 13.1. Preciznije, nalazi se od 7,668,401. do 7,687,549. para baza na kromosomu 17 (NLM, 2015).

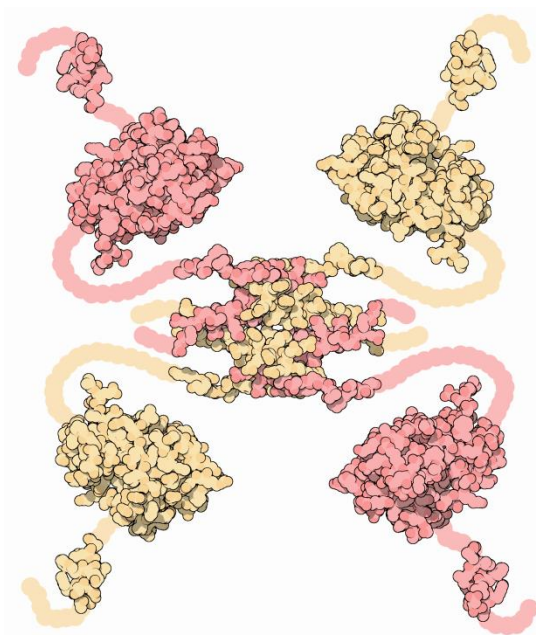
2.1.3. STRUKTURA GENA *TP53*

Navedeni gen sadrži 11 eksona (WHO, 2015) i obuhvaća DNA od 16 do 20 kb (Surekha i sur., 2011). Ima dva promotora: P1 smješten je uzvodno od eksona 1, a P2 je smješten unutar eksona 4. Gen *TP53* sadrži i interni ekson unutar introna 9, koji se naziva ekson 9b (Khoury i Bourdon, 2011).

2.1.4. STRUKTURA PROTEINA p53

Gen *TP53* kodira za protein p53. Protein p53 je protein od 53 kDa (NLM, 2015). Sastoji se od 393 aminokiseline (Najman, 2002). Podijeljen je u tri domene: amino-terminalnu domenu koja sadrži transaktivacijsku regiju, centralnu domenu koja se specifično veže na DNA, te karboksi-terminalnu domenu (Surekha i sur., 2011). Karboksi-terminalna domena je multifunkcionalna tj. sadrži tetramerizacijsku regiju i regulatornu regiju koja se može vezati na centralni dio proteina i tako onesposobiti specifične protein-

DNA interakcije (Loyo i sur., 2012). Protein p53 ima i 9 serinskih aminokiselinskih ostataka za fosforilaciju (Najman, 2002). Nalaze sa na karboksi-terminalnom kraju proteina. U blizini fosforilacijskog mjesta Ser316, između DNA-vezne domene i multifunkcionalne domene (Zorić i sur., 2010), nalazi se regija preko koje se vrši nuklearna translokacija, odnosno premještanje proteina p53 iz citoplazme stanice u njezinu jezgru (Najman, 2002). Kofaktor ovog proteina je cinkov ion (Zn^{2+}) (GCS, 2015).



Slika 2. Struktura p53 (Goodsell, 2002).

2.1.5. ALTERNATIVNI TRANSKRIPATI GENA *TP53*

Korištenjem dvaju promotora i alternativnim izrezivanjem mRNA nakon transkripcije gena *TP53* sintetiziraju se različite izoforme proteina p53. Prepisivanjem gena s promotora P1 nastaju izoforme koje imaju transaktivacijsko područje. Prepisivanjem s alternativnog promotora P2 unutar introna 4 nastaju izoforme bez transaktivacijskog područja kojima nedostaje dio amino-terminalne domene. Nedavno je utvrđeno da gen *TP53* kodira za niz različitih izoformi, još uvijek nerazjašnjenih bioloških funkcija. Izoforme $\Delta 133p53$ prepisuju se s alternativnog promotora P2 unutar introna 4, dok se izoforme $\Delta 40p53$ (p47) prepisuju s prvog promotora P1, ali nemaju isto inicijacijsko mjesto kao divlji tip p53 ili pak nastaju alternativnim izrezivanjem

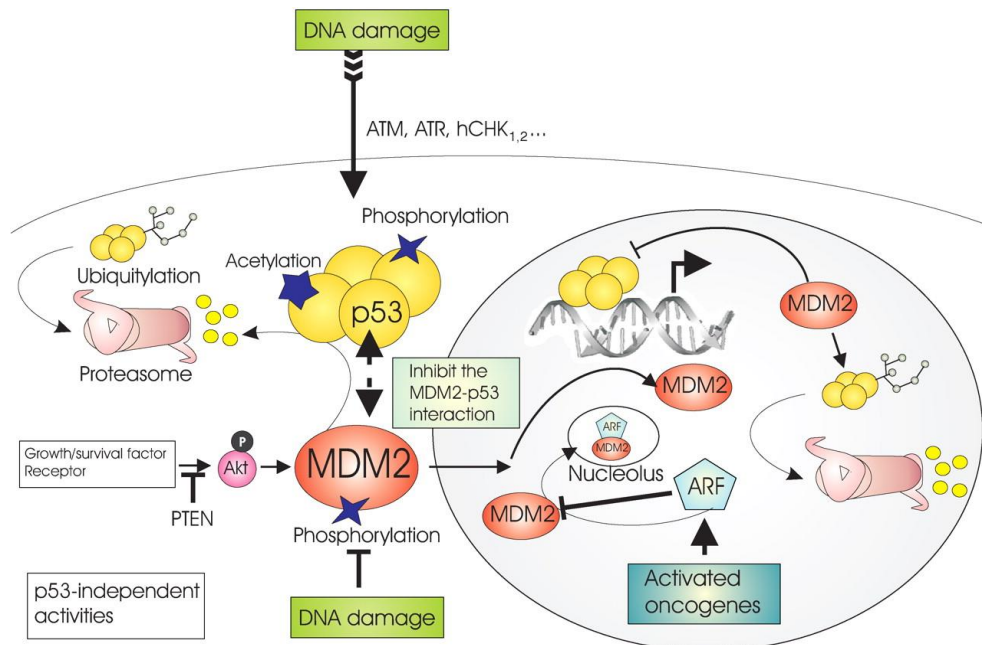
introna 2. Izoforme $\Delta 133p53$ i $\Delta 40p53$ zajednički se nazivaju $\Delta Np53$ jer im nedostaje dio ili cjelovito transaktivacijsko područje. Većina alternativnog izrezivanja, međutim, događa se na 3' kraju, od eksona 10 do 13, čime nastaju izoforme koje se razlikuju na svom C-kraju. Alternativnim izrezivanjem introna 9 gena *TP53* nastaju tri različite izoforme: p53, p53 β i p53 γ , od kojih p53 β i p53 γ nemaju karboksi-terminalnu domenu. Za sada je ukupno poznato devet varijanti proteina p53: p53, p53 β , p53 γ , $\Delta 133p53$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 40p53$, $\Delta 40p53\beta$ i $\Delta 40p53\gamma$ (Zorić i sur., 2010).

2.1.6. KONTROLA FUNKCIJE p53 POMOĆU PROTEINA MDM2

U normalnim uvjetima, odnosno kada stanica nije pod stresom, kao što je oštećenje DNA, hipoksija, skraćivanje telomera i aktivacija onkogena, p53 je veoma nestabilan protein s vremenom poluživota od 5 do 30 minuta, što se očituje njegovom malom količinom u stanicama koje nisu pod stresom. Za nestabilnost i kratko vrijeme poluživota ovog proteina zaslužan je gen *MDM2*. Ovaj gen kodira za protein MDM2. Gen *MDM2* je izvorno identificiran na dvostruko-minutnim kromosomima spontano transformiranih mišjih 3T3 fibroblasta, a protein MDM2 je kasnije nađen u fizičkom kontaktu s p53. U pokusu s implatacijom mišjih embrija koji nisu imali aktivan protein MDM2, preživjeli su samo oni koji nisu imali aktivan p53. Ovo je bio dokaz kako je kontrola funkcije p53 proteinom MDM2 veoma važana. Transkripcija gena *MDM2* inducirana je upravo proteinom p53. Tako su ove dvije molekule povezane preko mehanizma negativne povratne sprege, čime se omogućava održavanje niske razine p53 u stanicama koje nisu pod stresom. U principu, protein MDM2 je E3 ligaza i potiče degradaciju p53 preko ubikvitin-ovisnog puta na 26S proteosomima iz jezgre i citoplazme. Protein p53 se modificira tako što se na njega veže ubikvitin, a kovalentnim vezanjem poliubikvitinskog lanca na lizinske ostatke p53, započinje razgradnja p53 u proteosomima. MDM2 nosi E3 ubikvitin ligaznu aktivnost, specifičnu za njegove interakcije s p53, u kojoj se nalazi evolucijski očuvana COOH terminalna domena koja je ključna za E3 ligaznu aktivnost. MDM2 prenosi monoubikvitinske oznake na lizinske aminokiselinske ostake p53, najčešće na njegovom COOH kraju. Vezanje ubikvitina na p53 posredovanjem proteina MDM2 događa se u jezgri u kompleksu s p300/CREB-veznim proteinima (CBP), koji služe kao veza. Dok

MDM2 katalizira vezivanje monoubikvitinske oznake, kompleksi p300/MDM2 kataliziraju konačno vezanje poliubikvitinskog lanca na p53. Takav p53 odlazi na razgradnju u proteosomima. MDM2 također blokira transkripcijsku aktivnost p53, i to kad je u kompleksu s p53 i p300 u jezgri, tako što time blokira acetilaciju p53, koja bi aktivirala njegovu transkripcijsku aktivnost, koja je katalizirana s p300.

Ukoliko dođe do nekog od stresnih uvjeta za stanicu, potrebna je veća aktivnost p53. Ukoliko primjerice dođe do oštećenja DNA, dolazi do fosforilacije i p53 i MDM2, čime se onemogućava njihova interakcija, a istovremeno se i stabilizira struktura p53. Ako dođe do aktivacije onkogeni, oni aktiviraju ARF protein, koji se veže za MDM2 u jezgri stanice, kako bi se onemogućila degradacija p53 (Moll i Pretenko, 2003).

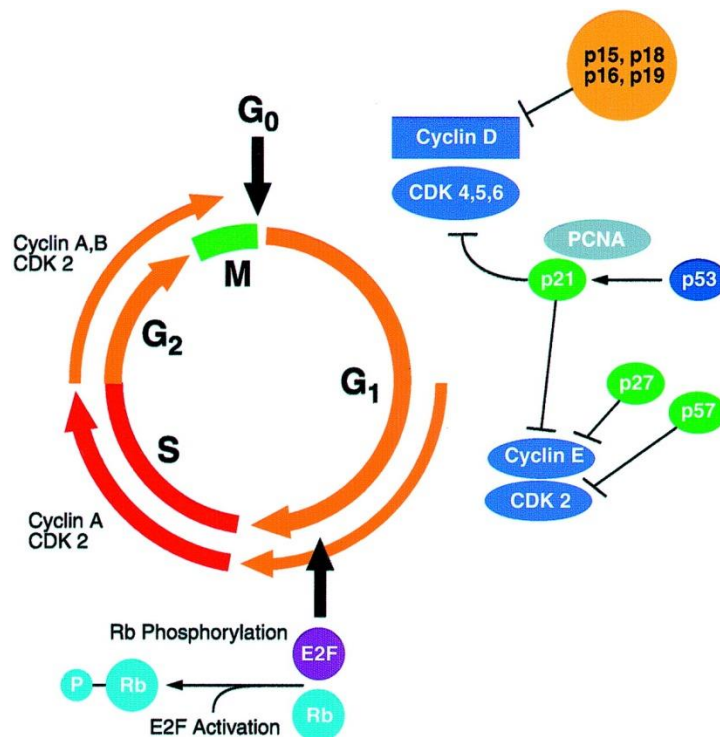


Slika 3. Kontrola funkcije p53 (Moll i Pretenko, 2003).

2.1.7. ULOGA PROTEINA p53

2.1.7.1. ULOGA PROTEINA p53 U NESTRESNIM UVJETIMA

Protein p53 je uključen u regulaciju staničnog ciklusa i jedan je od glavnih kontrolora koji dopušta prelazak stanici iz G1 u S fazu (Damjanov i sur., 2014).



Slika 4. Prikaz staničnog ciklusa (AHA, 2001).

Stanični ciklus predstavlja slijed događaja koji se ciklički ponavljaju u stanicama koje se dijele. Sastoji se od interfaze i mitoze. U interfazi stanica raste i duplicira broj kromosoma da bi se pomoću procesa mitoze podijelila na dvije stanice kćeri. Tijekom interfaze kromosomi su dekonenzirani. Interfaza se sastoji od G₁, S i G₂ faze. G₁ faza predstavlja interval između mitoze i početka replikacije DNA. Tijekom ove faze stanica je metabolički aktivna i neprestano raste. Na G₁ fazu nadovezuje se S faza tijekom koje se replicira, odnosno sintetizira DNA. Dovršenjem sinteze DNA započinje G₂ faza u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina potrebnih za mitozu. Nakon G₂ faze slijedi mitozu tj. proces u kojem se tijekom profaze, metafaze, anafaze i telofaze odvajaju kromosomi udvostručeni u S fazi interfaze i ravnomjerno raspoređuju u stanice kćeri. Ova faza završava citokinezom, odnosno podjelom citoplazme (Cooper i Hausman, 2010).

Kao kontrolor staničnog ciklusa, protein p53 ima sposobnost da prepozna oštećenje DNA te ostale nepovoljne uvjete u stanici (hipoksija, osmotski šok, nedostatak nutrijenata i sl.); stanicama koje imaju normalnu DNA p53

omogućava prelazak u S fazu, dok onima kojima je DNA oštećena p53 blokira taj prelazak (Damjanov i sur., 2014). Stanice koje pate od osmotskog šoka, hipoksije, nedostatka nutrijenata i sl., upućuju se putem apoptoze. Protein p53 isto tako kontrolira prelazak staničnog ciklusa iz G2 faze u mitozu u G2/M kontrolnoj točki (Taylor i Stark, 2001). Također, kontrolira i prelazak staničnog ciklusa iz metafaze u anafazu u mitozu, kontrolom diobenog vretena (Ha i sur., 2007).

2.1.7.2. ULOGA PROTEINA p53 U STRESNIM UVJETIMA

Gen *TP53*, kao što je već spomenuto, kodira za protein zvan tumor protein p53. Ovaj protein se ponaša kao tumor supresor, što znači da regulira dijeljenje stanica tako što onemogućava njihov prebrz i nekontrolirani rast i dijeljenje i time sprječava nastanak tumora. Zbog svoje uloge, p53 se još naziva i čuvarom genoma (NLM, 2015). Njegova se koncentracija povećava u stanici ukoliko dođe do pojave oštećenja DNA, jednolančane DNA, skraćivanja telomera, neregulirane aktivacije onkogeni, ili nekih drugih stresnih uvjeta za stanicu, kako bi mogao vršiti svoju proliferacijsku supresorsku ulogu (Goodsell, 2002). Na primjer, ako dođe do oštećenja DNA, najprije se p53 stabilizira fosforilacijom serinskih ostataka p53 te fosforilacijom i inhibicijom MDM2, pomoću kinaza aktiviranih u stresnim uvjetima (Loyo i sur., 2012). To su kinaze ATM i Chk2. Kinaza ATM stimulirana je oštećenjem DNA, a kinaza Chk2 stimulirana je kinazom ATM. Koncentracija p53 se u stanici također povećava, kao što je već rečeno, ukoliko dođe do neregulirane ekspresije onkogeni, kao što su Ras ili Myc. U ovom se slučaju stabilnost p53 osigurava pomoću ARF proteina koji veže MDM2 i time stabilizira p53. Treći način stabilizacije p53 je induciran oštećenjem DNA od strane kemoterapeutskih lijekova, UV zračenja i inhibitora protein-kinaza. Uključuje aktivnost kinaze ATR i kazein kinaze II (Vogelstein i sur., 2002).

Tom stabilizacijom omogućeno je vezanje p53 na DNA, tj. p53 se „aktivira“ (Loyo i sur., 2012). Protein p53 se najprije translocira u jezgru gdje se veže na DNA kao homotetramer (GCS, 2015) i djeluje na nju. Njegovo djelovanje na DNA se opisuje preko više mehanizama. Prema jednoj teoriji p53 djeluje kao transkripcijski faktor za gene koji djeluju supresivno na rast stanice. Druga teorija inhibicijsko djelovanje ovog proteina na transkripciju objašnjava time

da p53 sprječava vezanje TATA box vezujućih proteina na DNA, odnosno na promotore gena, zbog čega se ne događa transkripcija navedenih gena. Postoji i objašnjenje da protein p53 direktno stupa u interakciju sa replikacijskim aparatom te time sprječava replikaciju DNA (Najman, 2002).

Tokom staničnog ciklusa u kontrolnoj točki G1/S, ukoliko dođe do oštećenja DNA, protein p53 stupa u interakciju s oštećenom DNA, nakon čega dolazi do aktivacije nekoliko mogućih efekatora. Moguća je aktivacija inhibitora kinaza ovisnih o ciklinima, CDK (Damjanov i sur., 2014). Ciklini su proteini koji kontroliraju ulazak i izlazak u mitozu. Članovi porodice CDK udružuju se sa određenim ciklinima kako bi omogućili napredovanje kroz različite faze staničnog ciklusa. Preciznije, p53 zaustavlja stanični ciklus inducirajući transkripciju gena za CDK inhibitor p21 koji zaustavlja napredovanje staničnog ciklusa u G1 fazi inhibirajući komplekse CDK2/ciklinE, koji služe da stanica prijeđe kontrolnu točku G1/S (Cooper i Hausman, 2010), kao i kontrolnu točku G2/M i kontrolnu točku metafaza/anafaza (Novak i sur., 2002). Tako se zakoči stanični ciklus i omogući popravak DNA, te nakon popravka stanica nastavlja s mitotičkim ciklusom. Time p53 vrši ulogu kontrole staničnog ciklusa. Ako je popravak nepotpun ili defektan, stanica se upućuje na put koji vodi u apoptozu, čime započinje njegovo tumor supresorsko djelovanje. Alternativno, stanice ostanu trajno zakočene. Treća mogućnost je da p53 prepozna defekt DNA kao nepopravljiv i odmah uputi stanicu putem apoptoze (Damjanov i sur., 2014).

Protein p53 isto tako blokira i prelazak staničnog ciklusa iz G2 faze u mitozu stanicama s oštećenom DNA. Isto kao i u kontrolnoj točki G1/S, uključuje inhibiciju CDK2. Kako bi stanica iz G2 faze ušla u mitozu ključna je i ekspresija ciklina B1. Protein p53 također vrši represiju gena *ciklin B1* i gena *CDK2*, čime dodatno doprinosi blokiranju ulaska stanice s oštećenom DNA u mitozu (Taylor i Stark, 2001).

Tijekom mitoze, protein BubR1 kontrolira pravilno prihvaćanje mikrotubula na kinetohore u metafazi. Ukoliko dođe do nepravilnosti u diobenom vretenu, BubR1 stupa u interakcije s p53 te ga fosforilira kako bi ga stabilizirao. Nakon toga se stanice šalju putem apoptoze posredovanjem p53 (Ha i sur., 2007).

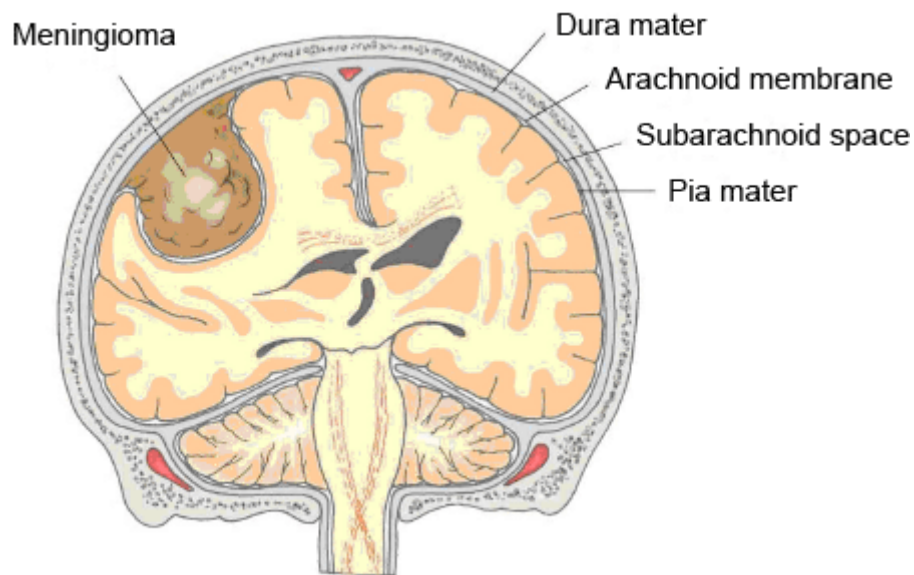
Protein p53 također ima i važnu ulogu u apoptozi. Apoptoza je fiziološki programiran oblik stanične smrti pri kojoj tkiva i organi održavaju svoj

normalan oblik i obujam (Damjanov i sur., 2014). To je kompleksan proces koji se odvija preko najmanje dva glavna puta, vanjskog i unutarnjeg, a oba se mogu regulirati na više razina. Protein p53 služi kao regulator apoptoze tako što kontrolira ključne točke apoptoze u oba navedena puta. Proapoptotska aktivnost p53 povezana je s njegovom transaktivacijskom sposobnosti. Dakle, p53 može aktivirati transkripciju proapoptotskih gena. Najveća veza između transaktivacije i apoptoze posredovane preko p53 je mogućnost p53 da kontrolira transkripciju proapoptotskih članova Bcl-2 obitelji, a to su multifunkcionalni *Bax*, *Puma*, *Noxa* te *Bid*, čime započinje unutarnji put apoptoze. Proteini koji se dobiju nakon transkripcije navedenih gena zatim uzrokuju otpuštanje proapoptotskih proteina iz mitohondrija, aktivaciju kaspaze, te apoptozu. Postoje i pretpostavke prema kojima p53 regulira i vanjski put apoptoze. Prema tim pretpostavkama *Fas/CD95* i *DR5*, geni za „death“ receptore na stanici koji sudjeluju u vanjskom putu apoptoze, kao i gen koji kodira za Fas ligand, *TNFSF6*, pod direktnom su kontrolom p53 (Fridman i Lowe, 2003).

2.2.MENINGEOMI

Meninge su tek tanke prozirne ovojnice mozga, zbog čega se mogu činiti beznačajnima. Međutim, one su osnova za nastanak posebnih, patološki važnih tumora. Meningeomi su jedni od najduže poznatih moždanih tumora. I prije pojave klasične patologije privukli su pažnju liječnika i laika zato što ponekad proizvedu različite deformacije (Forempoher, 2005).

Meningeomi (lat. *meningeoma*) su uglavnom benigni tumori koji nastaju od stanica arahnoideje mater. Arahnoidea mater je jedna od triju moždanih ovojnica koja je smještena između dure mater i pije mater (Damjanov i sur., 2014).



Slika 5. Položaj meningeoma (Mastumae, 2008).

Meningeomi čine oko 15% svih tumora u središnjem živčanom sustavu (Damjanov i sur., 2014), sa stopom godišnje incidencije 6/100 000 stanovnika. Mnogi se ni ne otkriju za života jer su mali, a nađu se na autopsiji u 1,4% slučajeva. Za razliku od većine intrakranijalnih tumora rastu sporo i obično ne infiltriraju mozak (Forempoher, 2005). Meningeomi se mogu pojaviti u bilo kojem dijelu moždanih ovojnica. Najčešće su tumori locirani na konveksitetu cerebralnih hemisfera, u području kavernoznoga sinusa, oko turskog sedla i kribrozne lamine, te oko velikog foramena. Oko 2% svih meningeoma nalazi se u kralježničnom kanalu (Damjanov i sur., 2014). Prema jednostavnijoj klasifikaciji, mogu se razlikovati četiri tipa meningeoma: fibroblastni, sincicijski, tranzicijski i angioblastni, ali se nalaze i mješoviti tumori. Danas se upotrebljava sustav histološke podjele prema WHO (engl. World Health Organization) iz 1993. godine, koji ujedno omogućuje stupnjevanje meningeoma u klasične (I stupnja), atipične (II stupnja) i anaplastične ili maligne (III stupnja) (Forempoher, 2005).

Meningeomi se najčešće javljaju u osoba srednje i starije dobi, s vrhuncem pojavljivanja za vrijeme šestog i sedmog desetljeća života. No, mogu se javiti i u dječjoj dobi, te u dubokoj starosti. Kod djece se, međutim, javljaju mnogo agresivniji oblici meningeoma (Forempoher, 2005). Meningeomi se češće pojavljuju u žena nego u muškaraca u omjeru 3:2 (Damjanov i sur., 2014). Od meningeoma u području leđne moždine češće oboljevaju žene. Meningeomi koji su udruženi s nasljednim tumorskim

bolestima općenito se javljaju u mlađih bolesnika i to podjednako u žena i muškaraca (Forempoher, 2005). Makroskopski se tumori očituju kao oštro ograničene, čvrste, okrugle tvorbe koje mogu biti male poput lješnjaka ili velike, promjera više od 10 cm. S jedne strane čvrsto se drže za tvrdnu moždanu ovojnicu, dok s druge strane prodiru u mozgovinu. Simptomi i klinički nalazi ovise o lokalizaciji tumora. Najčešće se pojavljuju senzorički i motorički ispadi zbog kompresije kore (Damjanov i sur., 2014). Simptomi su glavobolja, poremećaj vida te žarišni epileptični napadi (Forempoher, 2005). Na primjer, ako tumor pritišće optički živac, pacijent može izgubiti vid. Otprilike 90% meningeoma su benigni tumori (Chang, 2007). Prognoza je za bolesnike s dobroćudnim meningeomima uglavnom dobra (Damjanov i sur., 2014), iako se oko 25% bolesnika zapravo ne može izliječiti jer im tumor nije na povoljnoj poziciji za odstranjivanje (Chang, 2007), dok maligni meningeomi najčešće recidiviraju i metastaziraju (Damjanov i sur., 2014).

2.3. GENSKE PROMJENE NA GENU *TP53*

2.3.1. NAJČEŠĆE GENSKE PROMJENE NA GENU *TP53*

TP53 je jedan od tumor supresorskih gena koji djeluje kao antionkogen i suprimira prekomjernu proliferaciju stanica. Do pojave tumora može doći ukoliko se jedan od tumor supresorskih gena, pa tako i *TP53*, izgubi delecijom ili prestane normalno funkcionirati zbog mutacije ili neke manje delecije. U takvim stanicama kontrola staničnih signala izostaje, pa se slobodno mogu umnožavati i stanice s defektnom DNA. Stanice koje imaju oštećenu DNA tako postanu neoplastčne i nastave se nekontrolirano dijeliti (Damjanov i sur., 2014).

Preko 50% ljudskih tumora ima nekakvu gensku promjenu u *TP53* (Najman, 2002). Postoje najmanje tri strukturna i funkcionalna utjecaja genskih promjena na genu *TP53*. Najprije, to je utjecaj na strukturu proteina p53. Nadalje, to je i utjecaj na transaktivacijsku aktivnost, tj. dolazi do njezinog gubitka ili smanjenja. Također, javlja se i dominantni negativni efekt i efekt dobitka funkcije (engl. gain-of-function effect) (Magali i sur., 2010). Dominantni negativni efekt ostvaruje se heterooligomerizacijom stabilnijeg mutantnog p53

sa divljim tipom p53 kojeg eksprimira normalni preostali alel (Stojanev i sur., 2010), čime se inhibira djelovanje p53 divljeg tipa (Willis i sur., 2004). Protein p53 nakon što izvrši jednu od svojih funkcija, veže se na ubikvitin i degradira u proteosomima. Mutirani genski produkt gena *TP53* je otporan na degradaciju i zato se zadržava dulje u stanicama (Damjanov i sur., 2014). Tako nakupljeni p53 u tumorskim stanicama može sudjelovati s onkogenima, u procesu maligne transformacije stanica, što se naziva efekt dobitka funkcije (Magali i sur., 2010). Kao primjer može se navesti mišji model u kojem ekspresija promijenjenog p53 u stanicama limfoblastične leukemije ili mišjih fibroblasta rezultira u većoj tumorogenezi i tkivnoj invaziji u odnosu na stanice koje nemaju nikakvu ekspresiju p53 (Willis i sur., 2004).

Najčešće genske promjene na genu *TP53* su mutacije krivog smisla (eng. missense) i to u pojavnosti od 75%. Ostale genske promjene koje se javljaju su insercije i delecije koje uzrokuju pomak okvira čitanja (eng. frameshift) (9%), besmislene (eng. nonsense) mutacije (7%), istovjetne (eng. silent) mutacije (5%) te ostale promjene koje se pojavljuju u manje slučajeva (Petitjean i sur., 2007). Veće delecije su u većini slučajeva tumora rijetke (Stojanev i sur., 2010). Međutim, postoje tipovi tumora kod kojih su one izuzetno česte. Primjerice, to je multipli mijelom (Drach i sur., 1998). Multipli mijelom je zloćudna plazmastična, multifokalna neoplazma koja zahvaća koštanu srž i time razara dijelove skeleta, a najčešće one u kojima se odvija hematopoeza, dakle kosti lubanje, kralježnice, zdjelice i krajeve dugih kostiju udova (Damjanov i sur., 2014). Kod ovog su tipa tumora, dakle, delecije na kromosomu 17p u plazma stanicama jako česte, pa su tako česte i delecije gena *TP53*, kao i njegovog većeg dijela. Ovakve delecije povezan su i sa niskom stopom preživljenja pacijenata liječenih s kemoterapijom, ali i s pojavom recidiviranja multiplih mijeloma, pošto su veće delecije nađene u plazma stanicama više od polovice ovakvih pacijenata (Drach i sur., 1998). Veće delecije na kromosomu 17p također povećavaju i rizik razvitka kronične limfocitne leukemije (Chang i sur., 2010). Kronična limfocitna leukemija najčešća je vrsta leukemije u odraslih i čini oko 30% svih leukemija u dobi od 20 do 90 godina (Damjanov i sur., 2014).

U literaturi je opisano preko 34 000 genskih promjena na genu *TP53*. Uz to je također dokazano da samo 35 od sveukupnih 34 453 genskih promjena predstavljaju genske promjene koje ne utječu na nastanak tumora, odnosno ne doprinose njegovom razvoju (engl. passenger mutations) (Edlund i sur., 2012). Oko 280 od 393 kodona *TP53* gena biva pogođeno mutacijama, ali se one uglavnom grupiraju na DNA-vezujućoj domeni koja obuhvaća eksone 5-8 (Stojanec i sur., 2010) tj. od kodona 125 do 300 (Magali i sur., 2010) i to u 80% slučajeva (Zorić i sur., 2010). Većina promjena u strukturi DNA u ovom području (87,9%) su mutacije promjene smisla (eng. missense). No, izvan ovog područja, samo 40% genskih promjena predstavljaju takve promjene u redosljedu baza u DNA (Magali i sur., 2010). Promjene na kodonima 175, 248 i 273 odnose se na 19% svih do sada opisanih promjena na *TP53*, te se ova kodonska mjesta smatraju „vrućim točkama“ za promjene u sljedu baza u DNA. Novija istraživanja pokazuju kako ova kodonska mjesta, kao i mjesta 245, 249 i 282 predstavljaju najpromjenjivije lokuse na ovom genu (Stojanec i sur., 2010). Važno je napomenuti i da CpG dinukleotidi mutiraju deset puta više od ostalih nukleotida (Magali i sur., 2010).

2.3.2. GENSKJE PROMJENE GENA *TP53* I NJIHOVA UČETALOST U RAZLIČITIM OBLICIMA TUMORA

Genske promjene gena *TP53* u somatskim stanicama najčešće su od svih promjena *TP53* prisutnih u tumorskim stanicama. Prisutne su kod gotovo svih tumora i to u rasponu od 38% do 50% kod raka jajnika, jednjaka, debelog crijeva, glave i vrata, grkljana te pluća. Promjene gena *TP53* u zametnoj liniji, odnosno genske promjene koje osoba ima u spolnim i zametnim stanicama, a nasljeđuju ih potomci takve osobe, rjeđe su prisutne u tumorima, ali predstavljaju predispoziciju za razvitak tumora (tumori mozga, raka dojke, sarkoma i Li-Fraumeni sindroma) u ranoj životnoj dobi (Magali i sur., 2010). Većina ovakvih promjena je naslijeđena; točnije, u prosjeku, samo dvije od 18 promjena su *de novo* promjene gena *TP53* koje nastaju tijekom embriogeneze ili u spolnim stanicama roditelja (Avigad i sur., 1997). Ovakve genske promjene gena *TP53* javljaju se u oko 1 na 5 000 do 1 na 20 000 novorođenčadi. Također se, kao i genske promjene u somatskim stanicama,

najčešće javljaju u eksonima 5-8, te su to najčešće mutacije promjene smisla (Magali i sur., 2010).

Općenito, genske promjene na genu *TP53* dokazano utječu na pojavu nekoliko tipova tumora. Genske promijene na *TP53* u spolnim i zametnim stanicama povećavaju rizik od pojave raka dojke. Međutim, kao što je i prethodno navedeno, mnogo su češće one mutacije koje su nenaslijeđene, i pojavljuju se u 20 do 40% svih slučajeva raka dojke. Genske promjene na *TP53* također su povezane i s pojavom raka mokraćnog mjehura i nađene su u gotovo 50% svih osoba oboljelih od karcinoma pločastih stanica glave i vrata. Nadalje, razvoj Li-Fraumeni sindroma bi također mogao biti posljedica, ko što je već rečeno, promjene gena *TP53* u zametnim i spolnim (NLM, 2015). Uz to, kod osoba oboljelih od Li-Fraumeni sindroma, ukupno je nađeno 635 različitih genskih promjena gena *TP53* u zametnoj liniji, te 29,575 promjena *TP53* u somatskim stanicama (Brock i sur., 2013), pa je vidljivo i da je velik broj promjena u somatskim stanicama prisutan u ovom obliku tumora. Genske varijacije *TP53* povezane su i s pojavom tumora mozga, raka debelog crijeva, karcinoma jetre, raka pluća, osteosarkoma, rabdomiokarcinoma te karcinoma nadbubrežne žlijezde (NLM, 2015).

Neke su genske promjene češće od ostalih kod pojedinih tumora. Na primjer, tumori pluća sadrže bazne transverzije i tranzicije, ali tumori debelog crijeva primarno imaju tranziciju baza C u T. Dinukleotidi CpG su vrlo česta mjesta mutacija. Posebno je visoka učestalost transverzije G u T u genu *TP53* u tumorima kao što su tumori pluća i tumori jednjaka koji su vezani uz konzumiranje duhana. Benzopiren (BP), koji je komponenta duhanskog dima, pridonosi pojavi od oko 70% transverzija G u T u induciranim tumorima kože miša. Sličnu frekvenciju mutacija, ali s nižom stopom transverzija G u T, imaju tumori kože inducirani 7,12-di-metilbenz[a]antracenom. Također, tumori kože miša inducirani UV zračenjem uzrokuju u najvećoj mjeri C u T tranzicije. Iz svega navedenoga se može zaključak da različiti karcinogeni djeluju različito na gen *TP53* (Najman, 2002).

2.3.3. PROMJENE U INTRONSKOJ REGIJI GENA *TP53* I NJIHOVA UČESTALOST U RAZLIČITIM OBLICIMA TUMORA

Promjene u slijedu baza u DNA u kodirajućem dijelu gena *TP53* direktno utječu na redoslijed aminokiselina i općenito predstavljaju povećanu mogućnost pojave tumora kod osoba s takvim promjenama gena *TP53* (Surekha i sur., 2011).

Varijacije u intronima na genima vrše utjecaj na ekspresiju i transkripciju gena te na stabilnost mRNA dobivene nakon transkripcije ovakvih gena (Surekha i sur., 2011). Promjene u intronskoj regiji mogu inicirati netipično cijepanje pre-mRNA, čime nastaje mRNA koja translacijom dovodi do nastanka defektnog p53 proteina, te time onemogućiti tumor supresorsku ulogu p53 (Sailaja i sur., 2012). Neki introni sadrže regulatorne sekvence kao što su prigušivači i pojačivači tj. mjesta za vezanje elemenata koji reguliraju ekspresiju gena i tako utječu na sintezu produkta gena. Intronske varijacije mogu također utjecati na regulaciju gena preko abnormalnog spajanja ili prekida značajnih DNA-protein interakcija. Ovakve promjene u slijedu baza u DNA u intronskoj regiji mogu dovesti do novog mehanizma regulacije ekspresije gena, koji isto tako utječe na pojavu tumora. Međutim, još uvijek je nepoznat mehanizam kojim ovakve genske promjene dovode do nastanka tumora (Surekha i sur., 2011).

Polimorfizmi u intronskoj regiji imaju snažan utjecaj na napredovanje kronične mijeloidne leukemije (Sailaja i sur., 2012). Kronična mijeloidna leukemija je bolest pluripotentnih matičnih stanica, koja pretežno zahvaća granulocitnu lozu (Damjanov i sur., 2014). U istraživanju u kojem se direktno koristilo sekvencioniranje od 7 do 9 eksona, dokazano je kako su polimorfizmi na intronu 6 i 7 česti kod ove bolesti, te da pacijenti koji imaju ovakve polimorfizme imaju i slab odgovor na liječenje (Sailaja i sur., 2012).

Proučavana je povezanost između polimorfizama na intronu 6 i raka jajnika. Polimorfizam koji je u ovom slučaju bio proučavan je prijelaz baze G u A čime je ukinuto mjesto za rekstrikciju s enzimom MspI unutar introna 6 gena *TP53*. Ovo istraživanje ukazalo je na značajan udio alela sa izmijenjenim rekstriksijskim mjestom u bolesnicima koje boluju od raka jajnika (Marvidou i sur. 1998). Dokazano je da su polimorfizmi u intronu 6 gena *TP53* česti kod

tumora Li-Fraumen spektra kod pacijenata koji nemaju dodatne promjene gena *TP53*. Međutim, još je nejasan mehanizam kojim bi ove promjene mogle dovesti do pojave tumora. Također, proučavan je i utjecaj promjena na intronu 6 gena *TP53* u zametnoj liniji na različite tipove tumora kod djece, koja nisu imala nikakvu drugu gensku promjenu na *TP53*. Radilo se o šest pacijenata, od kojih su pet imali promjenu u zametnoj liniji. Svi tumori spadali su u skupinu Li-Fraumen sindroma. Jedno dijete je bolovalo od tumora mozga, dvoje od rabdomiosarkoma, a ostalo troje djece bolovalo je od akutne limfoblastične leukemije. Zaključak ovog istraživanja bio je da promjene na intronu 6 stabiliziraju protein p53, tj. dovode do njegove veće ekspresije, čime dolazi do njegovog nakupljanja u stanici, što efektom dobitka funkcije (engl. gain-of-function effect) i dominantnim negativnim efektom pospješuje nastanak tumora. Ovim istraživanjem nameće se zaključak da su promjene u strukturi DNA, posebno u zametnoj liniji, u nekodirajućoj regiji vrlo česte pojave u dječjih tumorima. Sličan slučaj je bio i sa majkom i kćeri koje su imale rak dojke, međutim nisu imale nikakvu promjenu na proteinu p53 te su također imale veliku razinu p53 u svojim stanicama. Također su imale mutaciju u intronskoj regiji (Avigad i sur., 1997).

Također je objavljeno da su polimorfizmi unutar introna 6 gena *TP53* snažno povezani sa povećanim rizikom od pojave gastrointestinalnih tumora, raka dojke kao i raka štitne žlijezde (Sailaja i sur., 2012).

2.3.4. DRUGI NAČINI INAKTIVACIJE p53

Osim genskih promjena na *TP53*, postoje i ostali načini inaktivacije proteina p53. Jedan od tih načina je i metilacija promotora. Abnormalna metilacija promotora gena *TP53* promatrana je u mnogo tipova tumora i povezana je s transkripcijskom inaktivacijom i prigušivanjem tumor supresorskog gena. Većina istraživanja su pokazala povezanost između metilacije *TP53* promotora i pada transkripcijske aktivnosti u kultiviranim stanicama s takvim *TP53* promotorom. Zbog pada ili prestanka transkripcijske aktivnosti ovog gena, onemogućeno je djelovanje p53, pa je ovakav način inaktivacije p53 povezan s nastankom različitih tipova tumora (rakom debelog crijeva, dojke, bubrega i želuca) (Kang i sur., 2001).

Također je dokazano da interakcije MDM2 proteina s korepresorom KAP1 dovode do inaktivacije p53 (Wang i sur., 2005). KAP1 je protein koji može ostvariti interakciju s mnogo faktora u stanici. Ekspresija gena *KAP1* povećana je u mnogo tipova tumora (Iyenger i sur., 2011). KAP1 sam ne pokazuje nikakav utjecaj na p53. Međutim, kada je njegova ekspresija povećana, ulazi u interakcije s MDM2, stimulira formaciju p53-HDAC1 kompleksa i inhibira acetilaciju i aktivaciju p53. Također u kompleksu s MDM2 omogućava vezanje ubikvitina na p53 i njegovu degradaciju. Time KAP1 doprinosi inaktivaciji p53 (Wang i sur., 2005).

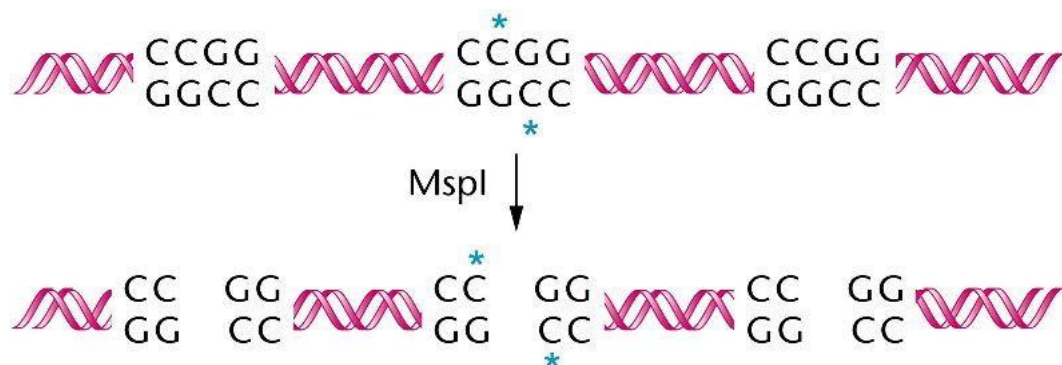
Prisutnost različitih mikroRNA isto tako može inaktivirati p53. mikroRNA (miRNA) su male nekodirajuće RNA molekule koje igraju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena na post-transkripcijskoj razini. Istraživanja su pokazala da miRNA stupaju u interakcije s p53 i njegovom mrežom. p53 regulira ekspresiju transkripcije i sazrijevanje skupine miRNA. S druge strane, miRNA mogu regulirati aktivnost i funkciju p53 putem izravne represije p53 ili njegovih regulatora u stanici. Mnoga su istraživanja otkrila važnu ulogu miRNA u tumorogenezi. Ukidanjem endogene ekspresije 90 različitih miRNA, pokazalo se da u tumorskim stanicama miRNA mogu regulirati staničnu proliferaciju i apoptozu, što ukazuje da miRNA mogu sudjelovati u tumorogenezi mijenjajući ekspresiju gena *TP53* (Feng i sur., 2011).

I struktura kromatina ima utjecaj na djelovanje p53. Kromatin ponekad mora izmijeniti svoju strukturu kako bi se omogućila transkripcija odeđenih gena. Pošto p53, između ostalog, ima funkciju transkripcijskog faktora, struktura kromatina je jako važna kako bi p53 omogućio transkripciju željenih gena i tako spriječio prekomjernu proliferaciju stanica (Allison i Milner, 2004).

2.4. PCR I NAČIN RESTRIKCIJE INTRONA 6 GENA *TP53* S RESTRIKCIJSKIM ENZIMOM Msp I

U ovom radu, za detekciju promjena u strukturi DNA introna 6 gena *TP53* korištena je analiza polimorfizma u duljini restrikcijskih fragmenata (RFLP, od eng. Restriction

Fragment Length Polymorphism) pomoću restrikcijske endonukleaze MspI, koja spada u restrikcijske enzime II skupine. Prije restrikcije umnožen je fragment DNA koji predstavlja dio introna 6 koji sadrži restrikcijsko mjesto za MspI. Umnožen je pomoću PCR-a, tj. lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction). Lančana reakcija polimerazom je brzi enzimski postupak kojim se male količine DNA mogu *in vitro* selektivno amplificirati, čak milijun puta u kratkom vremenu, na količinu potrebnu za analizu. PCR se temelji na opetovanim ciklusima triju reakcija: denaturacije nukleinske kiseline zagrijavanjem PCR smjese, hibridizacije primera ili početnica hlađenjem PCR smjese te ekstenzije početnica s DNA polimerazom koja dodaje nuklotide svakoj početnici. Ishod reakcija je sinteza dviju kopija ciljne sekvence. U prvom stadiju PCR-a grijanje uzrokuje kidanje vodikovih veza između A-T i G-C DNA izdvojene iz stanice. Kidanje vodikovih veza ima kao posljedicu odvajanje lanaca. U drugom stadiju snižavanjem temperature omogućeno je dvjema početnicama spajanje na ciljnu sekvenciju DNA. Početnice su komplementarne krajevima suprotnih lanaca DNA koje treba kopirati. Pri nižoj temperaturi dolazi do ponovne tvorbe vodikovih veza, i to između početnica i komplementarnih nukleotidnih sekvencija lanca DNA. Treći je stadij sinteza komplementarnoga lanca nove DNA. Za sintezu lanca potrebni su DNA-polimeraza i supstrat nukleotida. Svaka početnica spojena na molekulu jednolančane DNA uzrokuje tvorbu nove molekule jednolančane DNA. Nova molekula lanca na jednome kraju sadržava početnicu na koju je spojen niz nukleotida komplementaran prema nasuprot smještenom lancu DNA. Važno obilježje PCR-a je mogućnost korištenja lancima iz prvog ciklusa kao kalupima za sintezu novih lanaca u drugom ciklusu reakcije. Od jedne izvorne molekule DNA tijekom jednog sata tijekom reakcije nastaje više od milijuna novonastalih kopija, jer svaki ciklus traje do 15 sekundi (Kalenić i sur., 2013).



Slika 6. Restrikcijsko mjesto za MspI (Concept of Genetics, 2008).

Kao što je vidljivo iz slike, restrikcijsko mjesto za enzim MspI je palindromska sekvenca CCGG. Ovakvo mjesto može postojati i u intronu 6 gena *TP53*. Duljina fragmenta introna 6 umnoženog lančanom reakcijom polimerazom iznosi 107 pb. Restrikcijom umnoženog dijela introna 6 alela koji sadrži restrikcijsko mjesto za MspI nastaju dva fragmenta; jedan od 63 pb, a drugi od 44 pb. Osoba može biti homozigot s dva alela bez restrikcijskog mjesta, homozigot s dva alela sa restrikcijskim mjestom i heterozigot imajući jedan alel sa restrikcijskim mjestom i jedan alel bez restrikcijskog mjesta. Ukoliko se na ovom mjestu u intronu 6 u normalnih stanica nalazi restrikcijsko mjesto za MspI, a u tumorskom alelu postoji mutacija u tom restrikcijskom mjestu, neće doći do navedenog cijepanja u fragmentima DNA umnoženima iz tumorskog tkiva. Također neće doći do restrikcije ako je ovaj ili neki veći dio introna 6 koji sadrži ovu sekvencu deletiran (McDaniel i sur., 1991). Moguća je i potpuna delecija introna 6. Upravo su ova svojstva korištena u ovo radu kako bi se uvidjelo u kolikoj su mjeri zastupljene izmjene u strukturi DNA introna 6 u stanicama meningeoma u odnosu na zdravo tkivo.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI I KEMIKALIJE ZA ANALIZU

3.1.1. DNA UZORCI

Uzorci DNA dobiveni su izolacijom genomske DNA iz meningeoma, a također i iz leukocita istih pacijenata. DNA uzorak iz leukocita je korišten kao kontrola, tj. korišten je kako bi se mogla usporediti razlika u načinu cijepanja PCR produkta između DNA iz meningeomima i DNA iz zdravih stanica. Za izolaciju DNA iz meningeoma uzet je dio tkiva meningeoma te je iz njegovih stanica izolirana DNA. Za izolaciju DNA iz leukocita uzeta je krv istih pacijenata. Ukupno je bilo 19 pacijenata.

3.1.2.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA PCR

PCR smjesa sastoji se od 1x koncentriranog Flexi reakcijskog pufera (Promega, Madison, WI, SAD), 2 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, SAD), 0.2 mM svakog dNTP-a (Promega, Madison, WI, SAD), 0.2 μM svake početnice (Operon Biotechnologies, Huntsville, SAD), čiji su sljedovi 5'-AGGTCTGGTTTGCAACTGGG-3' i 5'-GAGGTCAAATAAGCAGCAGG-3'. U PCR smjesu dodaje se i 0.5 U Go Taq G2 Hot Start polimeraze (Promega, Madison, WI, SAD) te deionizirana i sterilizirana voda i 5 μL uzorka.

3.1.3.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA RESTRIKCIJU

Restriksijska smjesa sastoji se od 10 μL PCR uzorka, 0.2 μL restriksijskog enzima MspI aktivnosti 2.0 U (Fermentas, Vilnius, Litva), 2.5 μL 10x koncentriranog Tango pufera (Fermentas, Vilnius, Litva) te 12.3 μL destilirane i sterilizirane vode.

3.1.4.MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA ELEKTROFOREZU

Korišteni DNA marker za elektroforezu je 50 pb DNA step Ladder (Promega, Madison, WI, SAD). Koncentracija markera u gelu je bila 0.51 μg/μL. Korišteno je trokomponentno bojilo. Gel koji se koristio za provjeru PCR reakcije bio 2%-tni agarozni gel pripremljen tako da se u 100 mL 1x koncentriranog TAE pufera doda 2 g agaroze. 1x koncentrirani TAE puffer dobije se razrijeđivanjem 50x koncentriranog TAE pufera koji je pripremljen od 242 g Tris, 57.1 mL octene kiseline, 18.61 g EDTAdiNa tj. 100 mL 0.5 M

EDTA pH 8.0, te 1 L deionizirane vode. Gel koji se koristio za razdvajanje vrpca nakon restikcije bio je 4%-tni agarozni gel.

3.1.4. MATERIJALI I KEMIKALIJE KORIŠTENE ZA BOJANJE GELA

Za bojanje gela nakon elektroforeze korišten je etidij bromid. Otpina etidij bromida napravljena je tako da se u 1L vode doda 50 μ L otopine koja sadrži 10 mg/mL etidij bromida.

3.2. LABORATORIJSKI PRIBOR I APARATURA

Korišteni laboratorijski pribor bile su mikrokivete, pipetori, menzure, odmjerne tikvice te laboratorijske čaše. Aparatura koja je bila korištena je PCR uređaj (Eppendorf MasterCycler), uređaj za elektroforezu (ESP 200 Pharmacia Biotech) te transiluminator za vizualizaciju vrpca (LKB 2011 Maerovue) i laboratorijska vaga.

3.3. METODE ANALIZE

3.3.1. UMNAŽANJE DIJELA GENOMA PCR REAKCIJOM

Kao uzorci korištene su genomska DNA iz meningeoma oboljelih osoba paralelno s genomskom DNA iz leukocita istih osoba koja je služila kao kontrola, odnosno korištena je kako bi se usporedilo da li se cijepanje alela razlikuje između tumorske DNA i DNA iz leukocita. Umnožavan je dio genoma koji je varijabilan u populaciji i povezan je s pojavom tumora, a to je dio introna 6 gena *TP53* s restrikcijskim mjestom za MspI endonukleazu. Željeni dio introna 6 umnožen je postupkom lančane reakcije polimerazom (PCR). Određena količina DNA uzorka dodana je u PCR smjesu. PCR smjesa sadrži pufer i MgCl₂ koji su neophodni za aktivnost polimeraze, početnice, deoksiribonukleotid tri-fosfate (dATP, dGTP, dCTP i dTTP) koji su ključni za umnažanje DNA i enzim Taq DNA polimerazu te vodu. PCR smjesa s uzorkom se stavlja u PCR uređaj koji kontrolira uvjete umnažanja introna 6.

Najprije je temperatura podešena na 95°C kroz 5 minuta za početnu denaturaciju DNA. Nakon toga slijedi ciklus u kojem se najprije na 95°C tijekom 45 sekundi DNA denaturira, potom se komplementarno sparuju početnice na 51°C tijekom 45 sekundi te se na kraju ciklusa temperatura podiže na 72°C koja je optimalna za aktivnost Taq polimeraze kroz 45 sekundi radi

umnažanja željenog dijela introna 6. Postupak se ponavlja u 30 ciklusa, pri čemu se korak umnažanja DNA produžuje za 1 sekundu u svakom slijedećem ciklusu, nakon čega slijedi završna sinteza DNA na 72°C tijekom 3 minute.

Nakon PCR reakcije uzima se manji dio smjese i provjerava se uspješnost PCR reakcije elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu, vizualizacijom dobivenih PCR produkata na UV transiluminatoru nakon bojanja s etidij bromidom. Ostatak smjese se koristi u daljnjem radu.

3.3.2.RESTRIKCIJA

Restrikcija uzorka se, dakle, vrši s MspI uz dodatak Tango pufera, koji je neophodan za aktivnost enzima MspI. Restrikcija se odvija tijekom noći na 37°C.

3.3.3.ELEKTROFOREZA

Nakon restrikcije izvršena je analiza prisutnosti restriksijskog mjesta u DNA iz stanica meningeoma u odnosu na DNA iz leukocita elektroforezom u 4%-tnom agaroznom gelu pri 80V i 62 mA. Elektroforeza je trajala oko 2h. Nakon elektroforeze, DNA vrpce su vizualizirane pomoću etidij bromida. Nakon inkubacije 10 minuta u etidij bromidu, gel je ozračen UV svjetlom na transiluminatoru kako bi vrpce postale vidljive. Na dobivenim gelovima može se jasno vidjeti da li je došlo do restrikcije introna 6.

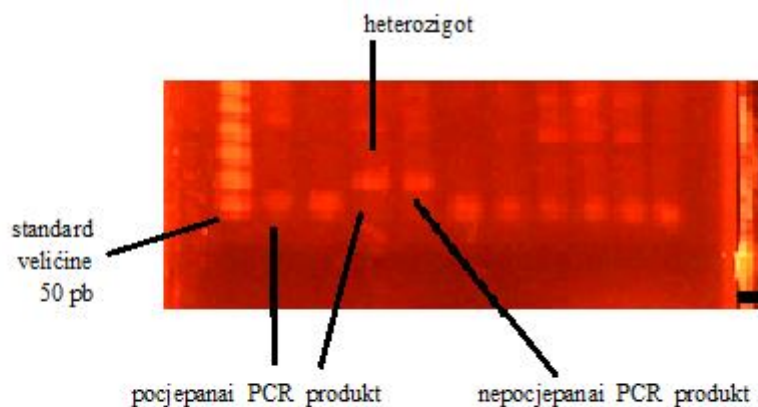
4.REZULTATI

Rezultati su bili očitavani na snimkama agaroznog gela nakon elektroforeze i vizualizacije vrpce. Šifre pacijenata i raspored uzoraka na gelovima dan je u tablici ispod svake slike.

PRIMJER 1.

Na gelu se u prvoj jažici nalazi standard veličine DNA fragmenata koji se sastoji od niza fragmenata čija se veličina povećava serijski za 50 pb. U ostalim jažicama nalazi se genomska DNA nakon restrikcije. Uzorci DNA pacijenata označeni su šifrom. „O“ označava kontrolu, odnosno genomsku DNA iz leukocita, a „T“ označava genomsku DNA iz stanica tumora, odnosno meningeoma. Kao što je već rečeno, sama umnožena DNA dijela introna 6, odnosno PCR produkt, ima 107 pb, PCR produkt pocijepan s restrikcijskim enzimom MspI daje fragmente veličine 44 pb i 63 pb. Prema položaju dobivenih vrpce na gelu nakon restrikcije u odnosu na marker veličine, može se odrediti da li je došlo do cijepanja ili ne.

Na ovom gelu je vidljivo da je u bolesnika pod šifrom 262 kontrola, odnosno PCR produkt iz leukocita, pocijepan na dva fragmenta. Na ovom je gelu došlo do slabijeg razdvajanja vrpce veličine manje od 100 pb, pošto je agarozni gel bio 2%-tni, pa je vidljiva samo jedna vrpca čija veličina odgovara veličini dvaju fragmenata pocijepanog PCR produkta. Iz toga se može zaključiti da je ova osoba homozigot sa restrikcijskim mjestom za MspI na oba alela gena. Kod ove je osobe na gelu, kod uzorka, odnosno PCR produkta iz meningeoma, vidljiva samo jedna vrpca koja odgovara pocijepanom PCR produktu. Kod osobe pod šifrom 263 su u kontrolnom uzorku na gelu vidljive dvije vrpce, od kojih jedna odgovara nepocijepanom PCR produktu, a druga odgovara pocijepanom PCR produktu, što znači da je došlo do restrikcije tako da je jedan alel gena pocijepan, dok je drugi ostao nepocijepan. Iz toga proslazi da jedan alel sadrži restrikcijsko mjesto, a drugi nema restrikcijsko mjesto. Ova je osoba, dakle, za ovo svojstvo heterozigot. Za ovu osobu su za uzorak iz meningeoma vidljive dvije vrpce od kojih jedna svojom veličinom odgovara nepocijepanom, a druga pocijepanom PCR produktu. Osobe pod šiframa 264, 266 i 267 su, kao i osoba pod šifrom 262, homozigoti s DNA koja sadrži restrikcijsko mjesto na oba alela gena. I kod ovih je osoba, isto tako, kod uzorka DNA iz meningeoma vidljiva samo jedna vrpca koja odgovara pocijepanom PCR produktu.



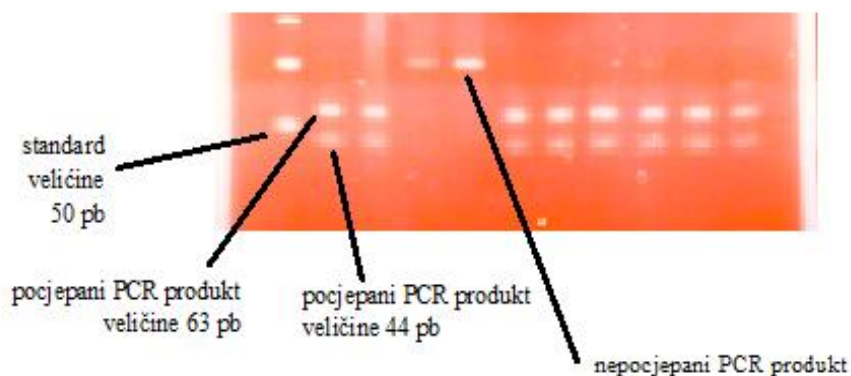
Slika 7. Gel 1.

Tablica 1. Položaj uzoraka u jažicama na gelu 1

jažica	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
uzorak	standard	262	262	263	263	264	264	266	266	267	267
		O	T	O	T	O	T	O	T	O	T

PRIMJER 2.

Na gelu 2 je rezultat za osobe pod šiframa 251, 12, 21 i 24 jednak. Kod DNA iz leukocita došlo je do cijepanja PCR produkta restriksijskom endonukleazom MspI na dva fragmenta u oba alela, što znači da su ove osobe homozigoti sa restriksijskim mjestom na oba alela gena. Na ovom su gelu, zbog većeg udjela agaroze (4%), vidljive odvojene vrpce za oba fragmenta pocijepanog PCR produkta. Također su za sve navedene pacijente vidljive dvije vrpce za uzorak iz meningeoma. Kod osobe 258, vidljiva je samo vrpca za kontrolni uzorak koja odgovara nepocijepanom PCR produktu. Zbog toga se može zaključiti da je ova osoba homozigot bez restriksijskog mjesta na oba alela. Zbog pretpostavke da zapravo u ovoj kontroli postoji alel sa restriksijskim mjestom, analiza ovog uzorka je ponovljena.



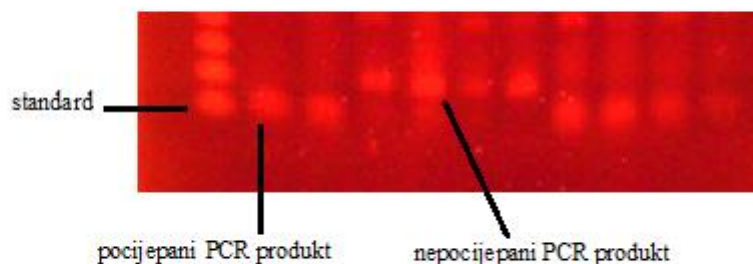
Slika 8. Gel 2.

Tablica 2. Položaj uzoraka u jažicama na gelu 2

jažica	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
uzorak	standard	251	251	258	258	12	12	21	21	24	24
		O	T	O	T	O	T	O	T	O	T

PRIMJER 3.

I ovdje su vrpce vizualizirane na 2%-tnom gelu. Na ovom primjeru gela je vidljivo, da je osoba pod šifrom 255 homozigot, tj. da oba alela gena imaju restriksijsko mjesto, pošto se na gelu nalazi samo jedna vrpca čija veličina odgovara veličini dvaju fragmenata pocijepanog PCR produkta. U uzorku iz meningeoma na gelu je vidljiva samo jedna vrpca koja odgovara pocijepanom PCR produktu. Isti je rezultat dobiven i za osobe pod šiframa 259 i 260. Kod osobe pod šifrom 258, u kontroli, PCR produkt je pocijepan endonukleazom samo u jednom alelu, dok je drugi alel ostao nepocijepan, pa je ova osoba stoga heterozigot za ovo svojstvo, tj. sadrži jedan alel sa restriksijskim mjestom i jedan alel bez restriksijskog mijesta. Kod ove osobe su za uzorak iz meningeoma dobivene isto tako dvije vrpce na gelu. Iz gela je također vidljivo da osoba 256, kao i 258, u svojem kontrolnom uzorku ima dvije vrpce, od kojih jedna odgovara za pocijepani, a druga za nepocijepani PCR produkt, pa se može zaključiti da je ova osoba heterozigot. Kod ove osobe su za uzorak iz meningeoma vidljive dvije vrpce, kao i kod kontrolnog uzorka ove osobe.



Slika 9. Gel 3.

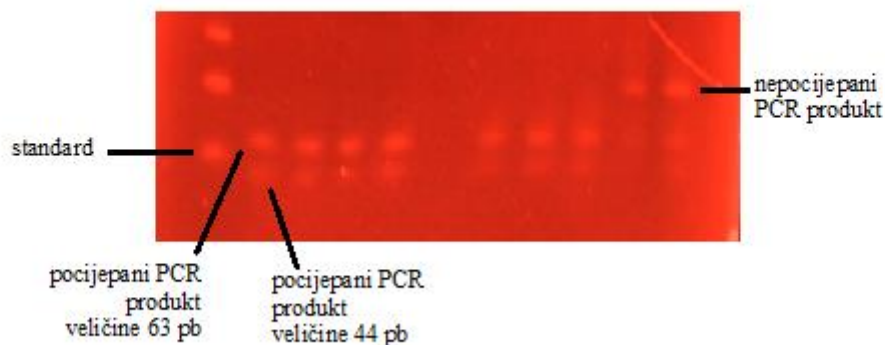
Tablica 3. Položaj uzoraka u jažicama na gelu 3

jažica	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
uzorak	standard	255	255	256	256	258	258	259	259	260	260
		O	T	O	T	O	T	O	T	O	T

PRIMJER 4.

Za oboljele osobe pod šiframa 240, 241 i 243 dobiven je jednak rezultat. Na gelu su, za kontrolni uzorak, vidljive dvije vrpce od kojih jedna odgovara pocijepanom PCR produktu veličine 63 pb, dok druga odgovara pocijepanom PCR produktu veličine 44 pb. Stoga se može zaključiti da su ove osobe homozigoti, tj. da oba alela gena sadrže restrikcijsko mjesto za ovu endonukleazu. Za ove osobe su za uzorak iz meningeoma isto tako dobivene dvije vrpce od kojih jedna odgovara pocijepanom PCR produktu veličine 63 pb, dok druga odgovara pocijepanom PCR produktu veličine 44 pb. Kod kontrolnog uzorka osobe pod šifrom 244 na gelu su vidljive 3 vrpce; prva odgovara nepocijepanom PCR produktu, druga odgovara pocijepanom PCR produktu veličine 63 pb, a treća vrpca odgovara pocijepanom PCR produktu veličine 43 pb. Prema tome može se zaključiti da je ova osoba heterozigot, što znači da posjeduje jedan alel gena koji sadrži restrikcijsko mjesto i jedan alel gena koji ne sadrži restrikcijsko mjesto. Za uzorak iz meningeoma je za ovu osobu na gelu dobiven jednak rezultat kao i za kontrolni uzorak. Kod uzorka DNA iz leukocita kod osobe pod šifrom 242

došlo je najvjerojatnije do pogreške tijekom PCR-a ili restrikcije jer vrpce koje odgovaraju DNA leukocita nisu vidljive.



Slika 10. Gel 4.

Tablica 4. Položaj uzoraka u jažicama na gelu 4

jažica	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
uzorak	standard	240	240	241	241	242	242	243	243	244	244
		O	T	O	T	O	T	O	T	O	T

UKUPNI REZULTATI

Od ukupno 19 osoba čiji je uzorak iz leukocita i meningeoma analiziran, 4 osoba su heterozigoti, koji dakle, sadrže jedan alel s restrikcijskim mjestom, a drugi bez restrikcijskog mjesta za MspI. Sve osobe koje su homozigoti sadrže oba alela gena koja imaju restrikcijsko mjesto za MspI. Od ova 4 heterozigota, svi su pokazali način restrikcije PCR produkta u meningeomima, koji je isti kao onaj u kontroli.

5.RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Kako bi se utvrdila učestalost promjena u strukturi DNA introna 6 gen *TP53* u meningeomima, korištena je metoda analize polimorfizma u duljini restrikcijskih fragmenata. Uzorci koji su nosili informaciju o učestalosti ovakvih promjena bili su uzorci DNA kod heterozigotnih pacijenata, kojih je ukupno bilo četiri. Heterozigotni pacijenti imaju jedan alel gena koji u PCR produktu, koji predstavlja dio introna 6, ima restrikcijsko mjesto za MspI, dok drugi alel nema to restrikcijsko mjesto u PCR produktu. Od ova 4 pacijenta, da je neki pacijent pokazao različit uzorak cijepanja PCR produkta i raspored vrpce u gelu između DNA iz meningeoma i leukocita, mogli bi reći kako je takav rezultat posljedica gubitka heterozigotnosti (LOH, od eng. Loss of Heterozygosity). Do gubitka heterozigotnosti došlo bi uslijed delecije dijela introna 6 na kojem se nalazi restrikcijsko mjesto za MspI ili neke veće delecije unutar gena *TP53* kojom se gubi ovo restrikcijsko mjesto. Do gubitka heterozigotnosti je moglo doći i zbog mutacije u restrikcijskom mjestu ili zbog pojave polimorfizma. Da li je do gubitka heterozigotnosti došlo zbog delecije, mutacije ili se radi o polimorfizmu nije moguće utvrditi ovom metodom.

Dakle, vidljivo je kako je u ovoj populaciji samo 21,05% pacijanata bilo informativno za ovaj genski marker. U niti jednog pacijenta nije uočen gubitak heterozigotnosti. Međutim, udio heterozigotnih pacijenata je u izvođenju ovog rada bio nizak, te bi se stoga analizu trebalo ponoviti na većem broju pacijenata.

6.LITERATURA

1. AHA (2001) Cell Cycle and Cell Migration. AHA – American Heart Association <<http://circ.ahajournals.org/content/103/24/2879/F1.expansion.html>>. Pristupljeno 7. srpnja 2015.
2. Allison, S.J., Milner J. (2004) Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis* [online] **25**(9), 1551-1557<<http://carcin.oxfordjournals.org/content/25/9/1551.full.pdf>>. Pristupljeno 1. Rujna 2015.
3. Avigad, S., Barel, D., Blau, O., Malka, A., Zoldan, M., Mor, C., Fogel, M., Cohen, I.J., Stark, B., Goshen, Y., Stein, J., Zaizov, R. (1997) A novel germ line p53 mutation in intron 6 in diverse childhood malignancies. *Oncogene* [online] **14** 1541-1545
<http://www.researchgate.net/profile/Ian_Cohen4/publication/14089484_A_novel_germ_line_p53_mutation_in_intron_6_in_diverse_childhood_malignancies/links/551123190cf2a8dd79bfcc02.pdf>. Pristupljeno 21. srpnja 2015.
4. Brock, K.E., Coopes, M.J., Sakamoto, K.M., Windle, M.L. (2013) Li-Fraumeni Syndrome. *Medscape* <<http://emedicine.medscape.com/article/987356-overview#a5>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2015.
5. Chang, H., Jilang, A.M., Connie, X.Y. (2010) Aberrant Nuclear p53 Expression Predicts Hemizygous 17p (*TP53*) Deletion in Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* [online] **133**, 70-74 <<http://ajcp.ascpjournals.org/content/133/1/70.full>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2015.
6. Chang, Z. (2007) Genetic Polymorphisms in Meningioma Formation and Progression. Research Science Institute of Massachusetts <<http://web.mit.edu/rsi/www/pdfs/papers/2005/2005-zenan.pdf>>. Pristupljeno 29. lipnja 2015.
7. Concept of Genetics (2008) The restriction enzymes MspI cuts the DNA sequences CCGG whether or not the cytosine is methylated. <http://bio3400.nicerweb.net/Locked/media/ch17/DNA-methylation_MspI.html>. Pristupljeno 29. lipnja 2015.

8. Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2010) Stanica, 5. izd., Medicinska naklada, Zagreb
9. Damjanov, I., Seiwerth, S., Jukić, S., Nola, M. (2014) Patologija, 4. izd., Medicinska naklada, Zagreb
10. David Goodsell & RCSB Protein Data Bank (2002) p53 Tumor Suppressor <<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=31>>. Pristupljeno 30. srpnja 2015.
11. Drach, J., Ackermann, J., Fritz, E., Krömer, E., Schuster, R., Gisslinger, H., DeSantis, M., Zojer, N., Fiegl, M., Roka, S., Schuster, J., Heinz, R., Ludwig, H., Huber, H. (1998) Presence of a p53 Gene Deletion in Patients With Multiple Myeloma Predicts for Short Survival After Conventional-Dose Chemotherapy. *Blood* [online] **92**(3) <<http://www.bloodjournal.org/content/92/3/802?sso-checked=true>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2015.
12. Edlund, K., Larsson, O., Ameer, A., Bunikis, I., Gyllensten, U., Leroy, B., Sudstrom, M., Micke, P., Botling, J., Soussi, T. (2012) Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online] **109**(24) 9551–9556 <<http://www.pnas.org/content/109/24/9551.full>>. Pristupljeno 20. srpnja 2015.
13. Feng, Z., Zhang, C., Wu, R., Hu, W. (2011) Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol* [online] **3**(1), 44-50 <<http://jmcb.oxfordjournals.org/content/3/1/44.full>>. Pristupljeno 1. Rujna 2015.
14. Forempoher, G. (2005) Klinička važnost otkrivanja proliferacijskih i antiproliferacijskih pokazatelja ljudskih meningeoma. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu <http://medlib.mef.hr/168/1/Gea-konacna_verzija.pdf>. Pristupljeno 24. travnja 2015.
15. Fridman, J.S., Lowe, S.W. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* [online] **22**, 9030–9040 <<http://www.nature.com/onc/journal/v22/n56/full/1207116a.html>> Pristupljeno 28. kolovoza 2015.
16. Gene Cards Suite (2015) TP53 gene <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53>>. Pristupljeno 8. srpnja 2015.

17. Ha, G.H., Baek, K.H., Kim, H.S., Jeong, S.J., Kim, C.M., McKeon, F., Lee, C.W. (2007) p53 Activation in Response to Mitotic Spindle Damage Requires Signaling via BubR1-Mediated Phosphorylation. *American Association for Cancer Research* [online] **67**(15), 7155-7164 <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/15/7155.full>>. Pristupljeno 31. kolovoza 2015.
18. Iyanger, S., Ivanov, A.V., Jin, V.X., Raucher, F.J., Farnham, P.J. (2011) Functional Analysis of KAP1 Genomic Recruitment. *Mol Cell Biol* [online] **31**(9), 1833–1847 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3133220/>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2015.
19. Kalenić, S. i suradnici (2013) *Medicinska mikrobiologija*, 1. izd., Medicinska naklada, Zagreb
20. Kang, J.H., Kim, S.J., Noh, D.Y., Park, I.A., Choe, K.J., Yoo, O.J., Kang, H.S. (2001) Methylation in the p53 Promoter Is a Supplementary Route to Breast Carcinogenesis: Correlation between CpG Methylation in the p53 Promoter and the Mutation of the p53 Gene in the Progression from Ductal Carcinoma *In Situ* to Invasive Ductal Carcinoma. *Lab Invest* [online] **81**, 573–579 <<http://www.nature.com/labinvest/journal/v81/n4/full/3780266a.html>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2015.
21. Khoury, M.P., Bourdon, J.C. (2011) p53 Isoforms. An Intracellular Microprocessor?. *Genes & Cancer* [online] **2**(4), 453-465 <<http://gan.sagepub.com/content/2/4/453.full>>. Pristupljeno 1. Rujna 2015.
22. Loyo M., Li RJ, Bettegowda C, Pickering C.R., Frederick M.J., Myers J.N., Agrawal N. (2012) Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck* [online] **35**(3) 454-63 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3715072/pdf/nihms440460.pdf>>. Pristupljeno 15. srpnja 2015.
23. Magali, O., Hollstein, M., Hainaut, P. (2010) TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* [online] 2:a001008 <<http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/1/a001008.full.pdf>>. Pristupljeno 10. srpnja 2015.

24. Marvidou, D., Gornall, R., Campbell, I.G., Eccles, D. M. (1998) TP53 intron 6 polymorphism and the risk of ovarian and breast cancer. *British Journal of Cancer* [online] **77**(4), 676-678 < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2149940/>>. Pristupljeno 5. lipnja 2015.
25. Mastumae, M. Isao, K. (2008) Understanding the tumor. Clinical study. *Medical Friend Co. Ltd.* [online] **29**(14) <<http://neurosurgery.med.utokai.ac.jp/en/patients/meningioma/index.html>>. Pristupljeno 5. lipnja 2015.
26. McDaniel, T., Carbone, D., Takahashi, T., Chumakov, P., Chang, E.H., Pirollo, K.F., Yin, J., Huang, Y., Meltzerl, S.J. (1991) The MspI polymorphism in intron 6 of p53 (TP53) detected by digestion of PCR products. *Nucleic Acids Res* [online] **19**(17) 4796 <<file:///C:/Users/Admin/Downloads/nar00097-0207b.pdf>>. Pristupljeno 23. srpnja 2015.
27. Moll, U.M. i Petrenko, O. (2003) The MDM2-p53 Interaction. *Mol Cancer Res* [online] **1**, 1001 < <http://mcr.aacrjournals.org/content/1/14/1001.full.html>>. Pristupljeno 27. kolovoza 2015.
28. Najman, S. (2002) Mutacije gena TP53 u karcinogenezi. *Acta Fac. Med. Naiss* [online] **19**(1), 19-22 <<http://www.medfak.ni.ac.rs/acta%20facultatis/2002/1-broj/rad-3.pdf>>. Pristupljeno 30. svibnja 2015.
29. NLM (2015) Genetics Home References. NLM – U.S. National Library of Medicine <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>>. Pristupljeno 24. travnja 2015.
30. Novak, B., Sible J.C., Tyson, J.J. (2002) Checkpoints in the Cell Cycle. *Macmillan Publishers Ltd* [online] <http://www.researchgate.net/publication/227986385_Checkpoints_in_the_Cell_Cycle>. Pristupljeno 28. kolovoza 2015.
31. Petitjean, A., Achatz, M.I.W., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., Olivier, M. (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* [online] **26**, 2157–2165 <<http://www.nature.com/onc/journal/v26/n15/full/1210302a.html>>. Pristupljeno 7. srpnja 2015.

32. Sailaja, K., Rao, V.R., Yadav, S., Reddy, R.R., Surekha, D., Rao, D.N., Raghunadharao, D., Vishnupriya, S. (2012) Intronic SNPs of *TP53* gene in chronic myeloid leukemia: Impact on drug response. *J Nat Sci Biol Med* [online] **3**(2), 182–185 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510914/>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2015.
33. Stojanev, S., Golubović, M., Babović, P. (2010) Mutacije TP53 gena – od čuvara genoma do onkogena. *Acta Medica Medianae* [online] **49**(1) <<http://publisher.medfak.ni.ac.rs/2010-html/1-broj/11-Slavica%20Stojnev%20MUTACIJE%20TP53%20GENA-59-63.pdf>>. Pristupljeno 18. srpnja 2015.
34. Surekha, D., Sailaja, K., Nageswara, D., Padma, T., Raghunadharao, D., Vishnupriya, S. (2011) Codon 72 and G13964C Intron 6 Polymorphisms of TP53 in Relation to Development and Progression of Breast Cancer in India. *Asian Pacific J Cancer Prev* [online] **12**, 1893-1898 <http://www.apocpcontrol.org/paper_file/issue_abs/Volume12_No8/1893-98%20c%203.29%20D%20Surekha.pdf>. Pristupljeno 30. svibnja 2015.
35. Taylor, W.R., Stark, G.R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* [online] **20**(15), 1803-1815 <<http://www.nature.com/onc/journal/v20/n15/full/1204252a.html>>. Pristupljeno 31. kolovoza 2015.
36. Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* [online] **408**, 307-310 <http://portal.ku.edu.tr/~agursoy/cmse-seminar/surfing_p53.pdf>. Pristupljeno 28. kolovoza 2015.
37. Wang, C., Ivanov, A., Lihong Chen, L., Fredericks, W.J., Seto, E., Rauscher, F.J., Chen, J. (2005) MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *The Embo Journal* [online] **24**(18), 3279-3290 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/sj.emboj.7600791/full>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2015.

38. WHO (2015) International Agency for Research on Cancer. WHO – World Health Organization <<http://p53.iarc.fr/RefsPolymorphisms.aspx>>. Pristupljeno 30. svibnja 2015.
39. WHO (2015) International Agency for Research on Cancer. WHO – World Health Organization. TP53 gen sequence, <http://p53.iarc.fr/TP53Sequence_NC_000017-9.aspx>. Pristupljeno 8. srpnja 2015.
40. Willis, A., Jung, E.J., Wakefield, T., Chen, X. (2004) Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* [online] **23**, 2330–2338 <<http://www.nature.com/onc/journal/v23/n13/full/1207396a.html>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2015.
41. Zorić, A., Horvat, A., Slade, N. (2010) Obitelj gena p53 – uloga u razvoju organizma i tumorigenezi. *Medicina fl uminensis* [online] **46**(2) 135-143 <[file:///C:/Users/Admin/Downloads/Zoric_The_p53_family_of_genes_in_development_and_tumors%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/Admin/Downloads/Zoric_The_p53_family_of_genes_in_development_and_tumors%20(2).pdf)>. Pristupljeno 15. srpnja 2015.