

# Defekt apoptotskog odgovora na cisplatinu uzrokovan R20Q varijantom proteina PMS2

---

**Marinović Terzić, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2008**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:916562>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Marinović Terzić**

**DEFEKT APOPTOTSKOG ODGOVORA NA  
CISPLATINU UZROKOVAN R20Q VARIJANTOM  
PROTEINA PMS2**

**Doktorska disertacija**

**Split, 2008.**

Disertacija je u cijelosti napravljena na “*Moore's Cancer Center, University of California, San Diego*”, u laboratoriju profesorice Jean YJ Wang.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Janoš Terzić

*Ovaj rad nikada ne bih uspjela uraditi bez pomoći dragih ljudi:*

*...prof. dr. sc. Jean YJ Wang*

*...Atsuko Yoshioka Yamashita, Irina Chuprinova Hunton*

*...prof dr.sc. Richard Kolodner*

*...prof. dr.sc. Ivan Đikić*

*...mojih dragih roditelja, prijatelja i obitelji*

*...i kao najzaslužnijeg – mog supruga i mentora Janoša.*

*Ovaj rad posvećujem najdražim momcima na svijetu*

*– Jakovu i Anti.*

## KAZALO

<b>TUMAČ KRATICA I ZNAKOVA .....</b>	<b>3</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>5</b>
1.1. Oštećenja molekule DNA .....	5
1.2. Popravljači pogrešno sparenih baza – MMR .....	6
1.3. Cisplatina .....	10
1.4. Protein PMS2 .....	15
1.5. Hipoteza .....	19
<b>2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>20</b>
2.1. Stanične linije korištene u istraživanju .....	20
2.2. Kreiranje ekspresijskih plazmida .....	20
2.3. Konstruiranje rekombinantnog retrovirusa i virusna infekcija stanica .....	20
2.4. Protutijela korištena u imunoblot tehnici .....	21
2.5. Imunoprecipitacija i transfeciranje stanica .....	21
2.6. Tretman cisplatinom .....	22
2.7. Analiza protočnom citometrijom .....	22
2.8. Test izlučivanja tripanskog plavila .....	22
2.9. Test klonskog preživljavanja .....	23
2.10. Test izlučivanja propidij jodida .....	23
2.11. Kloniranje pojedinačnih stanica i test mikrosatelitske nestabilnosti .....	24
2.12. Statistička analiza .....	24
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>26</b>

3.1. Cisplatina ne pojačava interakciju proteina PMS2-R20Q i p73 ....	26
3.2. Defekt PMS2-R20Q u aktivaciji stanične smrti nakon oštećenja DNA cisplatinom .....	29
3.3. Defekt odgovora PMS2-R20Q postoji i nakon pojačanog izražaja proteina p73 .....	35
3.4. Humani PMS2 i PMS2-R20Q proteini nisu korigirali pogrešno sparivanje baza u mišjim <i>Pms2</i> <i>-/-</i> stanicama .....	37
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>43</b>
<b>6. SAŽETAK .....</b>	<b>44</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>45</b>
<b>8. ETIČKA NAČELA .....</b>	<b>46</b>
<b>9. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>47</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>53</b>

## TUMAČ KRATICA I ZNAKOVA

- BER** - Popravak DNA izrezivanjem purinskih ili pirimidinskih baza (eng. *Base excision repair*)
- CDDP** - cis-diamindikloroplatina (cisplatina)
- DMSO** - Dimetilsulfoksid
- DNA** - Deoksiribonukleinska kiselina
- HNPCC** - Sindrom nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog crijeva (eng. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) ili Linch sindrom
- MEF** - Mišji embrijski fibroblasti (stanična linija)
- MLH1** - MMR protein, jedan od proteina u MutL $\alpha$  heterodimeru (eng. *MutL homology 1*)
- MMR** - Bjelančevine koje popravljaju pogrešno sparane nukleotide (eng. *Mismatch repair proteins*)
- MSI** - Test mikrosatelitske nestabilnosti (eng. *Microsatellite instability assay*)
- MutL** - Varijanta prokariotskog MMR proteinskog kompleksa
- MutS** - Varijanta prokariotskog MMR proteinskog kompleksa
- NER** - Popravak DNA izrezivanjem nukleotida (eng. *Nucleotide excision repair*)
- PMS2** - MMR protein, jedan od proteina u MutL $\alpha$  heterodimeru (eng. *Post-meiotic segregation increased 2*)
- R20Q** - Promjena aminokiseline arginin na poziciji 20 u glutamin (u proteinu PMS2)



- RT-PCR** - Lančana reakcija polimerazom tijekom koje se mjeri količina stvorene DNA (eng. *Real time – polymerase chain reaction*)
- SNP** - Promjene jednog nukleotida u molekuli DNA (eng. *Single nucleotide polymorphism*)
- Sub-G1** - Oznaka za količinu kromatina u stanici koji je manji od količine u G1 fazi staničnog ciklusa (mjereno protočnim citometrom)
- YFP** - Protein koji fluorescira žuto (eng. *Yellow fluorescence protein*)
- Wt** - Divlji tip (eng. *Wild type*) proteina

## 1. UVOD

### 1.1. Oštećenja molekule DNA

Molekula DNA nosilac je informacija o naslijeđu. Svaka promjena građe te molekule može dovesti do promjene neke nasljedne osobine. Vremenom se nakupljaju oštećenja DNA kao rezultat djelovanja različitih kemijskih (benzopirena, polikloriranih bifenila, dioksina, dima cigareta, azbesta), fizikalnih (različite vrste zračenja) i bioloških (virusi) agensa, ali i kao rezultat djelovanja unutarstaničnih reaktivnih metabolita, poput reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva (ROS i NOS) (1). Tijekom normalnog metabolizma DNA, odnosno njenog prepisivanja, popravka i rekombinacije, učestalo nastaju pogreške u DNA molekuli. Pogreške pri ugradnji nukleotida događaju se s vrlo različitom učestalošću, a to poglavito ovisi o vrsti aktivne DNA polimeraze. Općenito, replikacijske DNA polimeraze pokazuju visoku točnost, dok translezijske DNA polimeraze, čija je funkcija premošćivanje DNA oštećenja i osiguravanje kontinuiteta replikacije, imaju značajno nižu točnost ugradnje nukleotida u molekulu DNA (1).

Ako se DNA oštećenje ne popravi, postoji mogućnost nastanka mutacije u somatskoj ili reproduktivnoj stanici, što može promijeniti stanični fenotip i dovesti do nastanka razvojnih anomalija, tumora ili preranog starenja stanice (2). Da bi spriječila nastanak tih poremećaja, stanica posjeduje različite mehanizme popravka DNA i sprječavanja mutacija. Uz popravak DNA izrezivanjem baza (BER, eng. *Base excision repair*), te popravak izrezivanjem nukleotida (NER, eng. *Nucleotide excision repair*), neobično je važan i mehanizam popravka

pogrešno sparenih baza (3). Osim uloge u popravku DNA oštećenja, bjelančevine koje popravljaju DNA u eukariotskim stanicama sudjeluju i u prenosu signala o tim oštećenjima, kojima reguliraju stanični ciklus i programiranu staničnu smrt (4, 5). Grupa proteina pod imenom „popravljači pogrešno sparenih baza“ (eng. *Mismatch repair proteins*, MMR) ključna je za otkrivanje manjih oštećenja DNA, te za aktivaciju mehanizma popravka tih oštećenja (3).

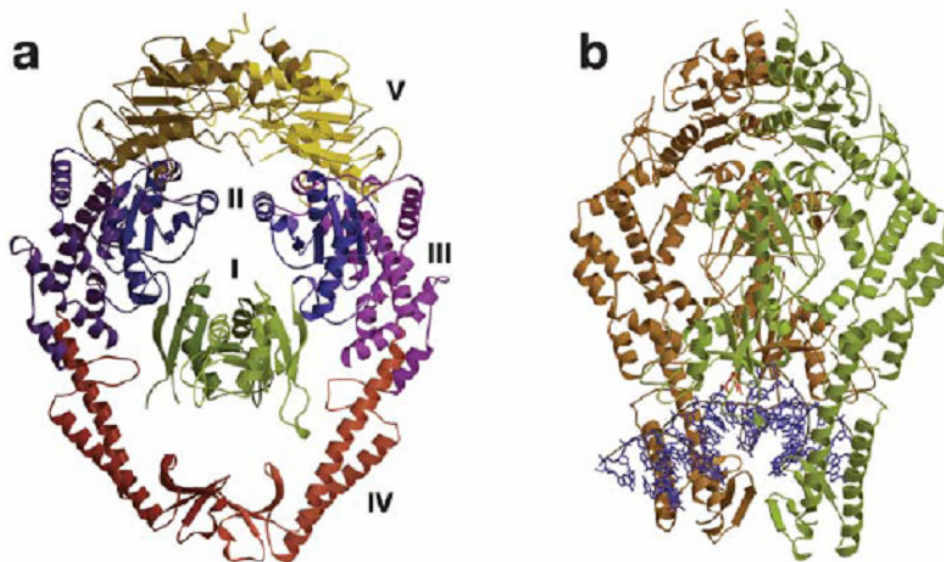
Za prepoznavanje lomova dvolančane DNA ili pogrešno sparenih baza zaduženi su proteinski kompleksi MRN (MRE11-RAD50-NBS1) i MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6), koji, kad se aktiviraju, pokrenu popravak DNA, te kontrolu staničnog ciklusa (3, 6).

## 1.2. Popravljači pogrešno sparenih baza – MMR

Osnovna uloga MMR proteina je prepoznavanje i sudjelovanje u popravku pogrešno sparenih nukleotidnih baza i manjih insercijsko/delecijskih oštećenja DNA, te regulacija apoptoze i G2/M kontrolne točke staničnog ciklusa (3).

Proteini MMR funkcionalno su podijeljeni u dvije grupe: 1. grupu funkcionalno srodnu s prokariotskim MutS proteinima – MSH proteini (protein homologan s MutS, eng. *MutS homology*) i 2. grupu funkcionalno srodnu s prokariotskim MutL proteinima – MLH proteini (protein homologan s MutL, eng. *MutL homology*) (7). MSH proteini funkcioniraju kao heterodimeri: tako je heterodimer MutS $\alpha$  sastavljen od proteina MSH2 i MSH6, a heterodimer MutS $\beta$ , čine MSH2 i MSH3 podjedinica. Njihova je osnovna uloga prepoznavanje pogrešno sparenih

baza i manjih insercijsko/delecijskih oštećenja molekule DNA (3) (Slika 1), ali imaju i važnu ulogu u regulaciji mitotičke i mejotičke DNA rekombinacije (8).

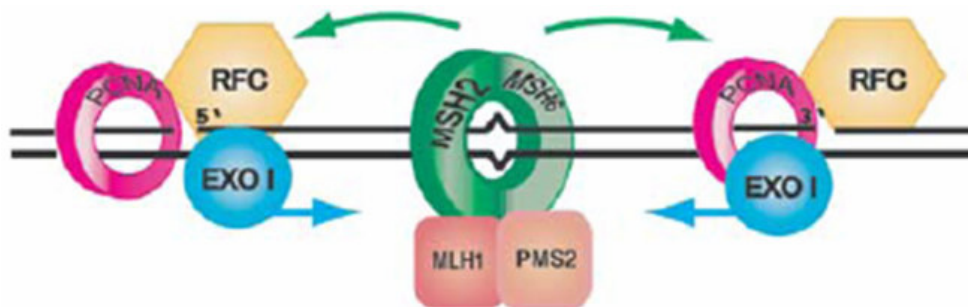


**Slika 1.** Struktura bakterijskog MutS dimera i model prepoznavanja pogrešno sparane baze. A) Struktura Taq MutS dimera sastavljenog od pet domena koje tvore gornji i donji kanal. B) Struktura Taq MutS na „iskrivljenoj“ DNA (plavo) na mjestu insercije jednog timina (crveno), vezanog uz donji kanal.

Prema Kunkel and Erie. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:681-710

MSH heterodimeri započinju popravak DNA privlačenjem MLH heterodimera pod imenom MutL $\alpha$ , sačinjenog od MLH1/PMS2 proteina, na mjesto oštećenja (3). Interakcija MSH i MLH proteina privlači druge proteine koji su nužni za popravak oštećene DNA, kao što su: PCNA (proliferirajući stanični nuklearni antigen, eng. *Proliferating cell nuclear antigen*), RPA (replikacijski protein A, eng. *Replication protein A*), egzonukleaza EXO1, te proteine važne za izrezivanje i razgradnju oštećene DNA (3) (Slika 2). Nakon izrezivanja i razgradnje

oštećene DNA, enzim DNA polimeraza konačno sintetizira normalni oblik molekule DNA (9). Osim navedenih proteina, u MMR sustavu *in vivo* zasigurno sudjeluje još nekoliko do danas neidentificiranih proteina.



**Slika 2.** Mehanizam djelovanja MMR sustava.

*PCNA* – *Proliferating cell nuclear antigen*; *RFC* – (hrv. Protein za stavljanje replikacijske stezaljke - replikacijski faktor C) *Clamp loader replication factor C*; *Exo1* – *Exonuclease 1*; *RPA* – *replication protein A*

Prema Kunkel and Erie. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:681-710

Procjenjuje se da MMR sustav poboljšava točnost replikacije DNA za oko tisuću puta (8). Insercijsko/delecijske lezije najčešće nastaju kao pogreška replikacije mikrosatelita (8). Mikrosateliti su ponavljajući dijelovi DNA sastavljeni od dva ili nekoliko nukleotida koji se u genomu ponavljaju u velikom broju. Tijekom replikacije DNA ponekad se dogodi da, zbog velikog broja ponavljanja, replikacija ne započne na pravom mjestu, pa u konačnici nastaje nosintetizirani lanac koji se po duljini razlikuje od lanca kalupa. Takva pogreška replikacije naziva se insercijsko/delecijska lezija (8). Upravo takve pogreške ispravlja MMR sustav, a ako on ne funkcionira, nastaje fenotip sklon mutacijama, što u konačnici dovodi do nastanka tumora. Biokemijska podloga popravka pogrešno sparenih baza u prokariotskim stanicama je

dobro poznata (10), ali taj sustav u eukariotskim stanicama nije u potpunosti rasvijetljen.

Poremećaji funkcije MMR sustava povezani su s povećanim rizikom za nastanak tumora, što je najočitije u sindromu „nasljednog nepolipoznog karcinoma debelog i završnog crijeva“ (eng. *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC ili Lynch sindrom) (11). No, osim u nasljednom HNPCC sindromu, poremećaji MMR proteina uočeni su i u sporadičnom obliku kolorektalnog karcinoma (12). S prosječnom incidencijom od 1‰ i životnim rizikom od 6%, karcinom debelog i završnog crijeva, prema broju smrtnih slučajeva, jedan je od tri vodeća zloćudna tumora u svijetu (13). HNPCC je najčešći oblik nasljednog karcinoma debelog crijeva i čini oko 8% od ukupnog broja kolorektalnih karcinoma (11). Da bi se dijagnosticirao HNPCC, prema internacionalno prihvaćenim dijagnostičkim kriterijima (tzv. Amsterdamski kriteriji II), tri ili više srodnika moraju imati neki od tumora povezan s HNPCC sindromom (kolorektalni karcinom, karcinom uretera, renalnog pelvisa ili tankog crijeva) i moraju zadovoljavati slijedeće:

- jedan od pacijenata mora biti bliski srodnik drugoj dvojici pacijenta
- bolest se pojavljuje u barem dvije uzastopne generacije
- barem jedan od pacijenata treba biti mlađi od 50 godina
- familijarna adenomatozna polipoza kolona treba biti dijagnostički isključena
- tumori trebaju biti potvrđeni patohistološkom dijagnostikom (14, 15).

Budući je za obitelji s malim brojem članova teško zadovoljiti sve gore navedene kriterije, uz Amsterdamske kriterije koriste se i kriteriji formulirani u Bethesda, SAD, 1997. godine, koji su nešto osjetljiviji, ali manje specifični od Amsterdamskih kriterija (14).

U sklopu HNPCC sindroma, kao podvrste razlikujemo tip I i tip II. Za razliku od HNPCC I, koji je karakteriziran karcinomima isključivo u području kolorektuma, u HNPCC II sindromu uz kolorektalni karcinom, oboljeli imaju i karcinom endometrija, tankog crijeva, uretera ili bubrega (11, 14).

Molekularna dijagnoza HNPCC sindroma obuhvaća analizu MMR gena na postojanje mutacija. Uobičajno se mutacija u jednom MMR genu nasljeđuje od roditelja, a tijekom života se dogodi sekundarna, somatska mutacija u preostalom, zdravom alelu gena, izazivajući tako potpuni gubitak funkcije tog MMR proteina (15).

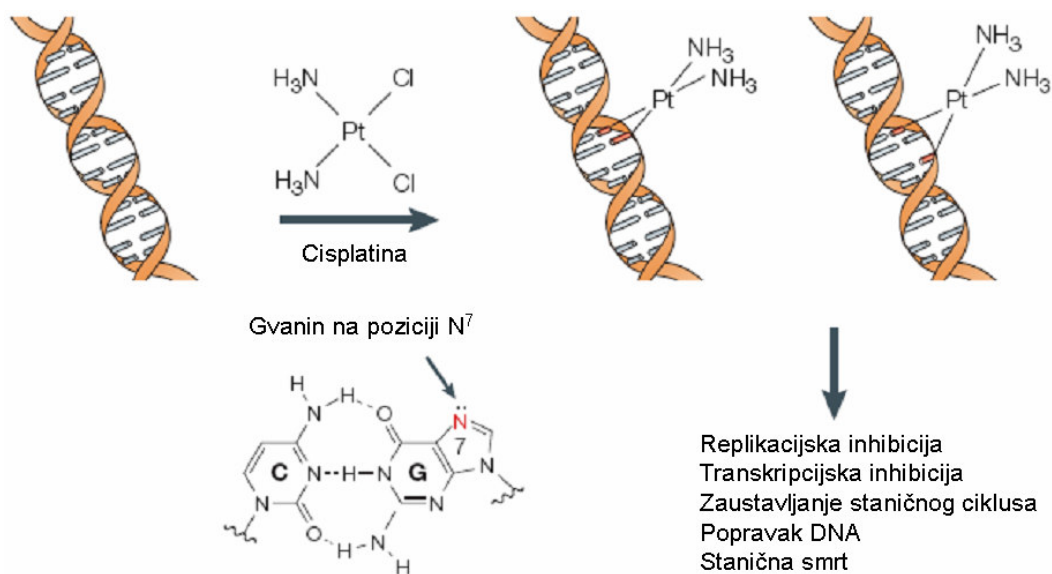
Među jedanaest do danas identificiranih MMR proteina, promjene u genima za MLH1, MSH2 i MSH6 odgovorne su za 95% svih mutacija identificiranih kod HNPCC bolesnika (16). Mutacije u genu za PMS2 protein rjeđe su od mutacija drugih MMR gena, ali su također povezane s HNPCC, te sa sindromom Turcot (17-19). Turcot sindrom je podvrsta HNPCC sindroma, za čiji su razvoj odgovorne mutacije u APC genu (genu za adenomatoznu polipozu kolona) ili nekom od MMR gena, prvenstveno PMS2, PMS1, MLH1 i MSH2 (15).

### **1.3. Cisplatina**

Oštećenja DNA oksidacijom, alkilacijom, te oštećenja koja dovode do unakrsnog povezivanja lanaca DNA, potiču MMR sustav na zaustavljanje staničnog ciklusa ili na aktivaciju programirane stanične smrti (20-22). MMR proteini nisu sposobni korigirati unakrsno povezane lance DNA, oštećenje DNA koje se javlja nakon djelovanja platinskih,

antineoplastičnih lijekova, kakav je cis-diamindikloroplatina (cisplatina, CDDP) (Slika 3). Takvo oštećenje DNA popravljiva se uglavnom djelovanjem NER sustava, dok je MMR sustav u ovom slučaju važan za signalizaciju oštećenja DNA i aktivaciju apoptoze (12).

Cisplatina je lijek iz porodice citostatika prvi put primjenjen u anti-tumorskoj terapiji 1971. godine (23). Budući se pokazala vrlo djelotvorna, uskoro je započela široka upotreba tog lijeka u različitim neoplazmama. No, štetnost (nefrotoksičnost, ototoksičnost, neurotoksičnost i mijelosupresija), kao i razvoj otpornosti, uskoro su ograničili primjenu cisplatine na svega nekoliko tipova neoplazmi, poglavito jajnika, testisa, grlića maternice i mokraćnog mjehura (23).



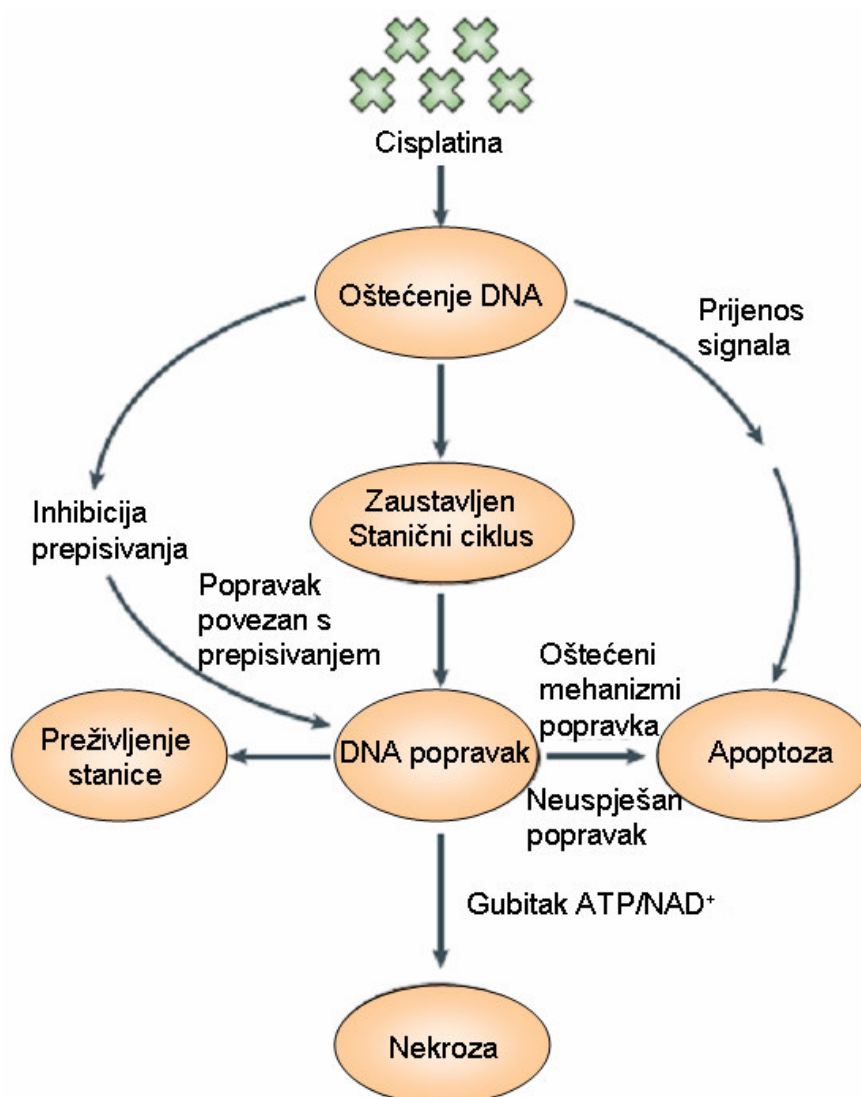
**Slika 3.** Nastanak oštećenja molekule DNA uzrokovanog cisplatinom i njegove posljedice. Prema Wang and Lippard, Nature Reviews. 2005;4:307-20

Atom platine kovalentno se veže za purinske baze i stvara 1,2 ili 1,3 unutarlančane ili međulančane ukrižene veze. Stanični odgovori su



različiti: zastoj replikacije, inhibicija transkripcije, zaustavljanje staničnog ciklusa, popravak DNA oštećenja ili stanična smrt.

Djelovanje cisplatine dovodi do stvaranja kovalentnih poprečnih sveza unutar i između uzvojnica DNA, što je uzrok inhibicije sinteze DNA (9). Sami cisplatinski adukti predstavljaju fizičku barijeru za replikacijske rašlje, što je jedan od uzroka inhibicije replikacije i zaustavljanja stanice u S-fazi staničnog ciklusa (8).



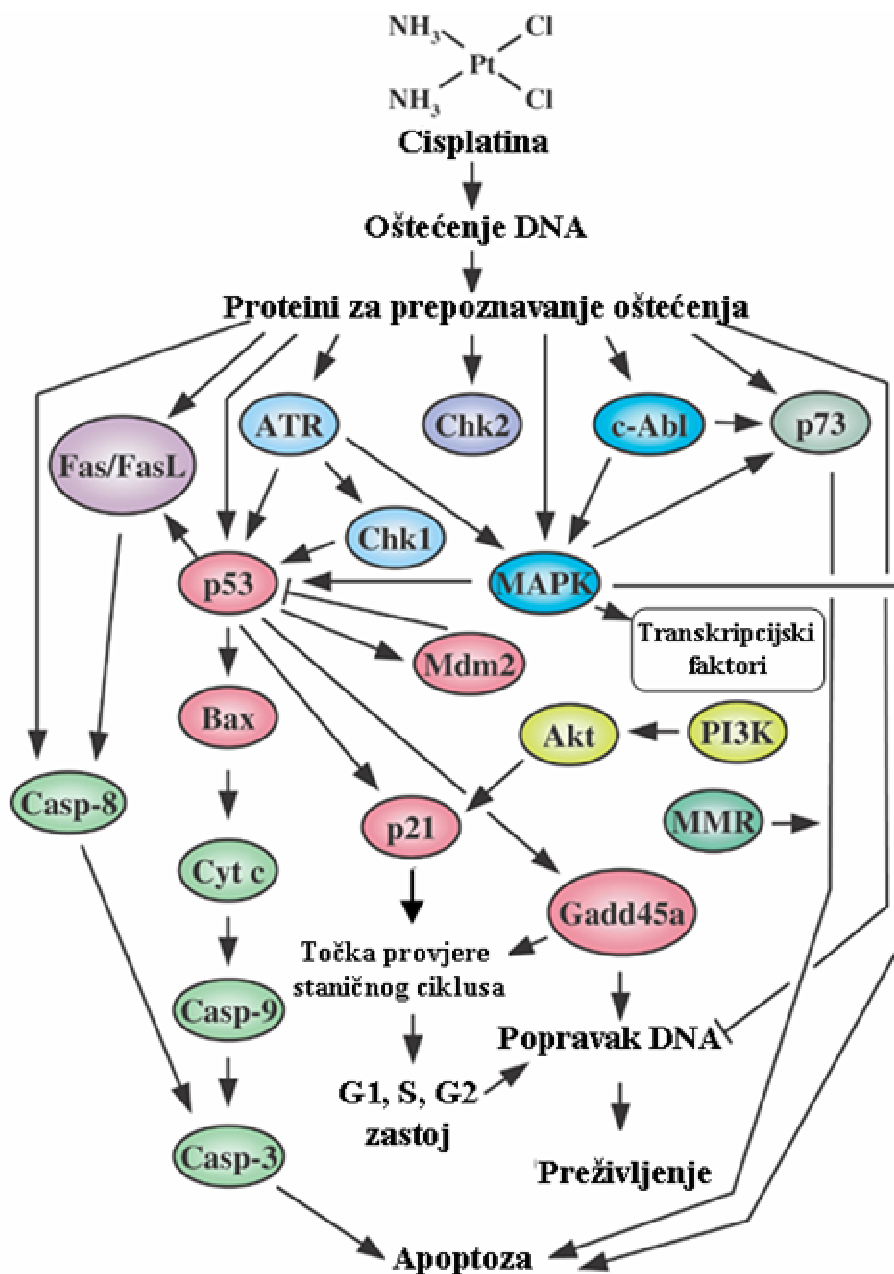
**Slika 4.** Shematski prikaz mogućih ishoda nakon oštećenja DNA cisplatinom. Prema Wang and Lippard, Nature Reviews. 2005;4:307-20

Prepoznavanje unakrsnog povezivanja nukleotida nastalog djelovanjem atoma platine zahtijeva međudjelovanje više proteinskih grupa, kao što su vrlo pokretljivi proteini (eng. *High mobility group*, HMG), MMR proteini, RNA polimeraza I, razni transkripcijski čimbenici i histoni (3, 24). Posljedice oštećenja DNA cisplatinom mogu biti: zaustavljanje napredovanja kroz stanični ciklus, stanična smrt ili, u slučaju popravka oštećenja, stanično preživljenje (9) (Slika 4).

Unutarstanični prijenos signala kod oštećenja DNA cisplatinom vrlo je složen. Apoptoza se aktivira kroz više signalnih putova, modulirana je ne-receptorskom tirozin kinazom c-Abl, signalnim molekulama ATR/Chk1, tumor supresorskim proteinima p53 i p73, signalnim molekulama JNK/SAPK, a svi navedeni signalni putovi su i međusobno povezani (3, 24) (Slika 5).

Nekoliko je studija pokazalo da su stanice u kojima je deficitaran MMR sustav otporne na djelovanje cisplatine (25-27), što se objašnjava poremećajem apoptotskog signaliziranja u tim stanicama (3). Defekt funkcije MMR sustava dovodi do dvostrukog povećanja otpornosti stanica na cisplatinu (8). Funkcija MMR sustava je održavanje integriteta genoma stanice djelujući na: a) prepoznavanje i korekciju pogrešaka DNA i b) signalizaciju stanične smrti onda kada DNA popravak ne uspije. No, mehanizmi kojim MMR koordinira DNA oštećenje i popravak, sa staničnim preživljavanjem ili odumiranjem nije poznat, ali je vrlo izgledno da postoji nekakva regulacija tih funkcija (28). Zaustavljanje staničnog ciklusa u G2/M kontrolnoj točki ili aktivacija stanične smrti posredstvom proteina MMR može nastati zbog: a) neuspješnog popravljivanja oštećenja DNA (koje rezultira dvolančanim

lomom DNA), ili b) zbog direktnog signaliziranja između MMR proteina i drugih proteina koji reagiraju na DNA oštećenje (29).

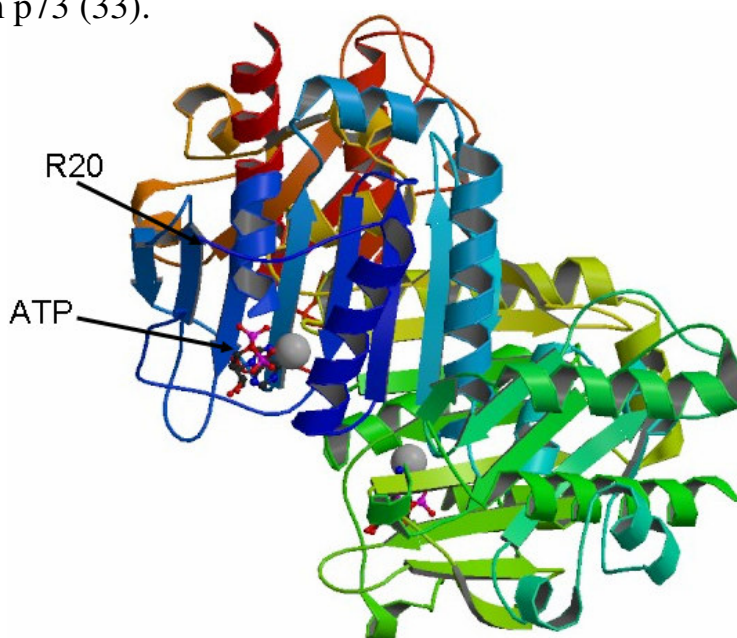


**Slika 5.** Shematski pregled signalnih putova povezanih s prijenosom signala o oštećenju DNA cisplatinom. Stanična smrt ili preživljenje ovise o intenzitetu stvorenog signala, te o međudjelovanju među navedenim putovima. Neke signalne molekule izostavljene su radi lakšeg razumijevanja. Prema Siddik Z.H. *Oncogene*. 2003;22:7265-79.

Teoriju o izravnom signaliziranju podržavaju genetske studije provedene na miševima, koje su pokazale da se sposobnost DNA popravka i pro-apoptotska funkcija proteina MSH2 i MSH6 mogu razdvojiti (30, 31). Isto tako, pokazano je da alkilirana DNA, uz pomoć MutS $\alpha$  i MutL $\alpha$  kompleksa, privlači i aktivira važnu signalnu molekulu, kinazu ATR, što također govori u prilog teoriji o direktnom prijenosu signala o oštećenju DNA putem MMR proteina (32).

#### 1.4. Protein PMS2

Protein PMS2 (eng. *Postmeiotic segregation increased 2*) je podjedinica MutL $\alpha$  kompleksa i neophodan je za aktivaciju apoptoze u slučaju oštećenja cisplatinom, gdje je njegovo djelovanje spregnuto s proteinom p73 (33).

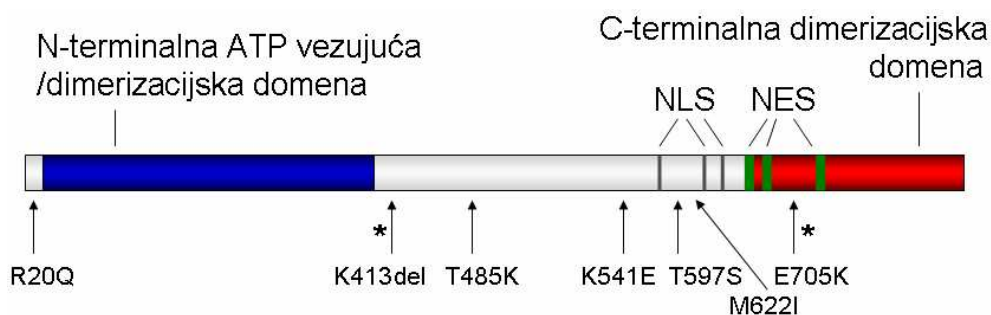


**Slika 6.** Kristalna struktura N-terminalnog 40 Kd fragmenta humanog PMS2 proteina. L1 nepravilna petlja – plavo. Prema Guarne A, Junop M-S, Yang W. *EMBO J.* 2001;20:5521-31.

Protein p73 je transkripcijski faktor, koji se uz p63 ubraja u porodicu proteina p53. Sljedovi aminokiselina proteina p53/p63/p73 identični su više od 60% (34). Protein p53, u literaturi je poznat i kao „čuvar genoma“ (eng. *Guardian of the genome*), zbog svoje neobično važne uloge u sprječavanju nastanka tumora (35). Osim strukturne homologije, proteini p53 i p73 također dijele funkciju aktivacije apoptoze, te regulacije staničnog ciklusa i supresije rasta stanice, djelujući na iste ciljne gene (36). Iako preko različitih mehanizama, oba proteina inducirana su nakon DNA oštećenja, a p73 pokreće apoptozu neovisno o p53 putu aktivacija apoptoze (34). Za razliku od p53 deficijentnih miševa, kod miševa koji nemaju protein p73 uočene su brojne razvojne anomalije, poput disgeneze hipokampusa, hidrocefalusa, kronične infekcije i upale, ali nije uočena povećana sklonost nastanku tumora (37). Protein p53 najčešće je mutiran gen u tumorima čovjeka, a činjenica da su neke tumorske stanice ipak osjetljive na kemoterapiju, čini apoptotski put ovisan o proteinu p73 vrlo važnim (34-36).

Protein PMS2 neophodan je za aktivaciju proteina p73 u slučaju oštećenja DNA, što je dokaz izravne signalizacije putem MMR proteina (33). Ljudski protein PMS (eng. *Human PMS*, hPMS) postoji kao hPMS1 i hPMS2, a oba obnašaju funkcije unutar MMR sustava i mogu biti mutirani u HNPCC ili Turcot sindromu (38). Miševi bez izražaja PMS2 gena su neplodni, pokazuju abnormalnosti u formiranju kromosomske sinapse tijekom mejoze, imaju sklonost mikrosatelitskoj nestabilnosti, te razvoju sarkoma i limfoma (39). Protein PMS2 je izrazito polimorfan. U javnim bazama podataka naveden je veliki broj SNP-ova (polimorfizam pojedinog nukleotida, eng. *Single nucleotide polymorphism*) za humani PMS2 gen. Devetnaest SNP-ova se pojavljuje

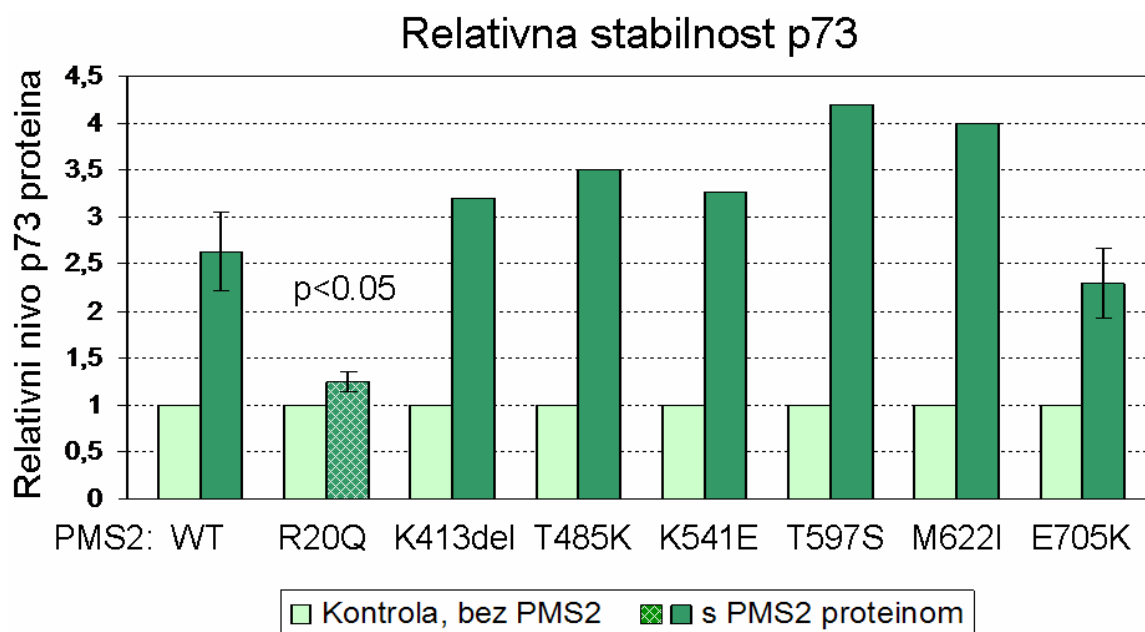
u kodirajućoj sekvenci gena, a 12 ih dovodi do zamjene neke od aminokiselina. U početnom dijelu ove studije testirana je interakcija sedam polimorfnih varijanti proteina PMS2 s MLH1 i p73 proteinom (Slika 7).



**Slika 7.** Struktura i polimorfne varijante humanog proteina PMS2. Shematski prikaz proteina PMS2 i razmještaj sedam testiranih varijanti. NLS – Signal za lokalizaciju u jezgri; NES – Signal za eksport iz jezgre.

Povezivanje PMS2 s p73 dovodi do stabiliziranja p73 proteina (33). Početno testiranje interakcije sedam polimorfnih varijanti proteina PMS2 i p73, pokazalo je povećanje nivoa proteina p73 kod šest od sedam ispitivanih varijanti (Slika 8). PMS2-R20Q je jedina od ispitivanih varijanti koja nije dovela do povećanja razine proteina p73. Kod te varijante proteina PMS2, dvadeseta aminokiselina po redu, arginin (R) (N-terminalni dio proteinske molekule) zamijenjena je aminokiselinom glutamin (Q). Nesposobnost R20Q varijante da povisi razinu p73 navodi na zaključak da ta varijanta proteina PMS2 smanjuje stabilnost kompleksa PMS2 i p73.

Da bi MMR proteini mogli nesmetano obavljati svoje uloge u popravku DNA, važno je njihovo premještanje iz citoplazme u jezgru. Dimerizacija (međusobno udruživanje) proteina PMS2 i MLH1 u MutL $\alpha$  heterodimer neophodna je za lokalizaciju ovog kompleksa u jezgri (28).



**Slika 8.** Interakcija proteina PMS2 i p73.

Navedene PMS2 varijante izražene su zajedno s p73. Stanični lizati analizirani su imunoblot tehnikom. Relativne količine p73 proteina u stanicama sa (tamni stupići) i bez (svijetli stupići) PMS2 proteina.

Prema Marinovic Terzic I., et al. PNAS, *In press*.

Prethodne su studije pokazale da formiranje heterodimera između PMS2 i MLH1 (MutL $\alpha$ ) povećava stabilnost proteina PMS2 (40). Miševi kod kojih je „ugašen” MLH1 gen, gube izražaj proteina PMS2 (41). Kada je u stanici u „mirovanju“ uz PMS2 ili PMS2-R20Q istovremeno izražen (ko-ekspimiran) i MLH1, nivo proteina PMS2 je povećan kod svih ispitivanih varijanti PMS2 proteina, pa tako i R20Q (što bi odgovaralo nastanku MutL $\alpha$  kompleksa).

Prethodna studija pokazala je da je za aktivaciju apoptoze ovisne o p73 proteinu neophodno funkcioniranje MLH1 proteina (42). PMS2 je kao monomer izrazito nestabilan, tako da bez izražaja MLH1 proteina nema ni izražaja PMS2 proteina (41), a jedna druga studija je pokazala da je zapravo postojanje PMS2, a ne MLH1, neophodno za

aktivaciju apoptoze posredstvom proteina p73, u slučaju oštećenja DNA cisplatinom (33).

Spoznaja da je R20Q varijanta proteina PMS2 manjkava u stabiliziranju p73 proteina, usmjerila je daljnje istraživanje upravo na tu varijantu proteina PMS2.

## 1.5. Hipoteza

Ova je studija pokušala definirati učinke poremećene funkcije varijante R20Q na aktivaciju apoptoze u slučaju oštećenja cisplatinom, budući je ustanovljeno da PMS2-R20Q varijanta ne povećava stabilnost proapoptotskog proteina p73.

Kako je djelovanje proteina PMS2 neophodno za aktivaciju proteina p73 cisplatinom (29, 33), pretpostavljeno je da je ta funkcija kod varijante R20Q oštećena.

Budući je aktivacija kaspaznog slijeda osnovni efektorski mehanizam apoptotske stanične smrti, pretpostavljeno je da u usporedbi s divljim tipom proteina PMS2, njegova varijanta R20Q pokazuje odstupanje u funkciji aktivacije kaspaza.

Pretpostavljeno je da poremećena aktivacija apoptoze kod R20Q varijante uzrokuje otpornost na terapiju cisplatinom, često korištenim kemoterapijskim sredstvom.



## 2. MATERIJALI I METODE

**2.1. Stanične linije korištene u istraživanju:** HEK 293T; „Phoenix<sup>TM</sup> eco packaging“ stanice (Orbigen, San Diego), 3T3 uzgojeni iz *Pms2*<sup>-/-</sup> MEF stanica (C18.2 linija) (39); te Cos-1 stanice. Medij korišten za rast stanica je DMEM, obogaćen s 10% goveđeg fetalnog seruma, te s 50 I.U./ml penicilina i streptomocina (Cellgro).

**2.2. Kreiranje ekspresijskih plazmida:** Kodirajuća sekvenca (cDNA) bjelančevine PMS2, p73 ili MLH1 ubačena je u plazmide pCMV-myc i u pEYFP koji su joj omogućavali naknadni izražaj u stanicama. Tehnikom QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagen), napravljeni su i klonirani plazmidi sa željenim sekvencama, a ispravnost sekvence je provjerena sekvencioniranjem DNA.

**2.3. Konstruiranje rekombinantnog retrovirusa i virusna infekcija stanica:** Kodirajuća sekvenca (cDNA) humanog proteina PMS2 (divlji tip ili R20Q) klonirana je u pBABEpuro retrovirusni vektor, između BamH1 i SnaB1 pozicije. Ekotrofični virusi s PMS2 DNA proizvedeni su pomoću Phoenix<sup>TM</sup> stanične kulture za pakiranje retrovirusa (Orbigen). C18.2 stanice tretirane su s „Polybrene“-kationskim polimerom (1 µg/ml) tijekom 30 minuta, a zatim su izložene djelovanju virusa tijekom 48h na 37°C. Inficirane stanice selekcionirane su djelovanjem puromicina tijekom 10 dana (2 µg/ml).

Izvorna stanična linija potječe iz mišjih embrijskih fibroblasta, bez izražaja PMS2 proteina (eng. *Pms2*-knock out). U stanice je retrovirusnom

infekcijom ubačen plazmid pBABEpuro s cDNA za PMS2 protein (wt ili R20Q), a u treću liniju stanica uveden je „prazni“ (plazmid bez proteina od interesa) pBABEpuro vektorski plazmid. Na ovaj način dobivene su stanične linije sa stabilnim izražajem navedenih proteina, a bez mišjeg PMS2 proteina. Ove linije stanica korištene su u svim testiranjima staničnog odgovora na oštećenje cisplatinom.

**2.4. Protutijela korištena pri imunoblot tehnici:** anti-myc (Clontech); anti-HA (Covance); anti-MLH1 (G168-728, Pharmingen); anti-PMS2 (A16-4, Pharmingen); anti-p73 (246, Imgenex), anti-aktin (AC-40, Sigma Aldrich), anti- pocjepana kaspaza 3 (Asp175, Cell Signaling) i anti-kaspaza 9 (C-9, Cell Signaling).

**2.5. Imunoprecipitacija i transfeciranje stanica:** U HEK 293T stanice prolazno je ubačena (eng. *Transient trasfection*) kodirajuća DNA gena od interesa, čime je postignut izražaj te bjelančevine u stanicama. Stanice su bile transfecirane s: HA-p73, te s myc-PMS2, myc-PMS2-R20Q ili “praznim” pCMV vektorom, koristeći kemikaliju FUGENE6 (Roche Molecular Biochemicals). Nakon 24h stanice su tretirane s 25 Mm CDDP/24h, te su žrtvovane u TNE puferu za liziranje (100 mM Tris-HCl, Ph 7.5, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) uz koktel inhibitora proteaza (Roche Molecular Biochemicals). Stanični lizati centrifugirani su na 10,000 g/4°C, pročišćeni s A/G protein-sefarnim zrcima (Santa Cruz Biotechnology) tijekom 1h na 4°C, pomiješani su s 2 µg anti-HA, ili anti-myc protutijelom i 20 µL A/G protein-sefarnih zrnaca i inkubirani tijekom 3h na 4°C. Nakon centrifugiranja, sefarna zrnca su isprana tri puta puferom za liziranje i zagrijana na 95°C/4 min u SDS (natrij-

dodecilsulfat) puferu. Uzorci su analizirani elektroforezom i imunoblot tehnikom.

**2.6. Tretman cisplatinom:**  $1 \times 10^6$  c18.2 MEF stanica nasijano je u 6-centimetarske zdjelice i inkubirano preko noći, nakon čega su stanice tretirane s 25  $\mu$ M cisplatinom tijekom 24h. MEF stanice su na taj način zaustavljene u kasnoj S i G2/M fazi staničnog ciklusa. Da bi izazvali apoptozu, stanice su isprane i inkubirane u svježem mediju s 25  $\mu$ M cisplatinom. Za praćenje dinamike stanične smrti, stanice su tijekom 24h žrtvovane u nekoliko vremenskih točaka (u triplikatima).

**2.7. Analiza protočnom citometrijom:** Nakon tretmana cisplatinom prikupljene su plutajuće i pričvršćene stanice, isprane s fosfatnim puferom (PBS), obilježene s Propidij-jodidom (PI, boja koja se veže za DNA) (0.5  $\mu$ g/ml PI, 0.1% Triton-X100, 1 mM Tris, Ph 8, 0.1 mM EDTA, 0.1% Nacitrat, 50  $\mu$ g/ml RNase) tijekom 30 minuta u tami i na ledu, te nakon toga analizirane protočnim citometrom FACS-Calibur (eng. *Fluorescence activated cell sorter*; BD Biosciences). Udio stanica sa sub-G1 DNA sadržajem izmjeren je koristeći CellQuest program. Stanice netretirane cisplatinom korištene su kao kontrola za određivanje praga mjerenja sub-G1 populacije stanica. (Udio stanica sub-G1 izračunat je kao broj stanica s količinom propidium jodida (DNA) manjom od praga G1, koji je određen vrškom krivulje histograma (G1 faza staničnog ciklusa), podijeljen s ukupnim brojem stanica.)

**2.8. Test izlučivanja tripanskog plavila** (eng. *Trypan blue exclusion assay*): U određenim vremenskim točkama, nakon tretmana cisplatinom,

prikupljene su plutajuće i adherirane stanice, isprane i resuspendirane u određenom volumenu fosfatnog pufera, te je 15  $\mu$ l stanične suspenzije pomiješano s 15  $\mu$ l tripan plavila (1% otopina u PBS). Stanice su brojane u komorici hemocitometra unutar 15 minuta od početka bojanja, te im je određena viabilnost. Izbacivanje tripan plavila iz stanice svojstveno je samo živim stanicama, pa se odumrle stanice bojaju modro.

### **2.9. Test klonskog preživljavanja** (eng. *Clonogenic survival assay*):

Nasijano je 200 c18.2 stanica u svaki zdenac ploče od 6 zdenaca, u 2 ml DMEM + 10% FBS medija. Slijedećeg dana stanice su tretirane s 8  $\mu$ M CDDP tijekom 1h, ili s 0  $\mu$ M CDDP (kontrola). Nakon ispiranja DMEM medijem tri puta, stanice su uzgajane daljnjih 10 dana, a medij je zamijenjen svježim. Nakon 10 dana, medij je uklonjen, kolonije su isprane fosfatnim puferom i bojane 30 minuta otopinom za bojanje i fiksaciju (0.25% kristal violet, 3.5% formaldehid, 80% metanol). Nakon obilnog ispiranja vodom, kolonije su prebrojane. Udio preživjelih kolonija izračunat je kao broj kolonija u cisplatinom tretiranim zdencima podijeljen s brojem kolonija u kontrolnim zdencima. Klonsko preživljavanje *Pms2*-deficitarnih MEF stanica s izražajem vektora, PMS2 ili PMS2-R20Q rađeno je u triplikatu, a test je ponovljen četiri puta.

### **2.10. Test izlučivanja propidij jodida** (eng. *PI exclusion assay*):

$3 \times 10^5$  c18.2 stanica zasijano je u svaki zdenac ploče od 6 zdenaca. Suspendirane stanice su transfecirane pEYFP-p73 plazmidom, ili „praznim“ pEYFP plazmidom, koristeći 2  $\mu$ g plazmida i 6  $\mu$ l FUGENE6 po zdencu. 24h nakon transfekcije stanice su tretirane 25  $\mu$ M CDDP/24 h, ili 0  $\mu$ M CDDP (kontrola). Plutajuće i adherirane stanice su prikupljene, isprane fosfatnim

puferom i obojane otopinom propidij jodida (1  $\mu\text{g/ml}$  PI + 1% FBS) u fosfatnom puferu. Unutar 30 minuta nakon bojanja, protočnim citometrom FACSCalibur izmjeren je udio PI pozitivnih stanica među YFP pozitivnim stanicama. Podaci su rezultat četiri nezavisna pokusa u kojima su mjereni dvostruki uzorci.

### **2.11. Kloniranje pojedinačnih stanica i test mikrosatelitske nestabilnosti.**

*Pms2*<sup>-/-</sup>-MEF stanice inficirane „praznim“ retrovirusnim vektorom, vektorom s PMS2 genom, ili vektorom s PMS2-R20Q genom, zasijane su u vrlo malom broju i uzgajane tijekom tri tjedna. Nakon formiranja individualnih kolonija, kolonije su izolirane i uzgajane u posebnoj kulturi tijekom slijedećih šest tjedana. Izražaj PMS2 proteina testiran je imunoblot tehnikom pomoću protutijela protiv PMS2. Za svaki genotip odabrane su po dvije kolonije i izolirana je genomska DNA. Genomska DNA razrijeđena je do ekvivalenta od 0.5 do 1 genoma (DNA iz jedne stanice). Višestruko je ponavljena PCR analiza za dva dinukleotidna markera (D7Mit91 i D17Mit123), koristeći  $\gamma\text{-P}^{32}$  obilježene začetnice. Amplifikacija je započeta denaturacijom na 94°C tijekom 5 minuta, a zatim slijede 30 ciklusa na 94°C – 30 sekundi, 58°C – 30 sekundi, 72°C – 30 sekundi, i finalna ekstenzija na 72°C – 7 minuta. PCR produkti analizirani su elektroforezom na 6% denaturirajućem poliakrilamidnom gelu, te autoradiografijom Kodak BioMax filma.

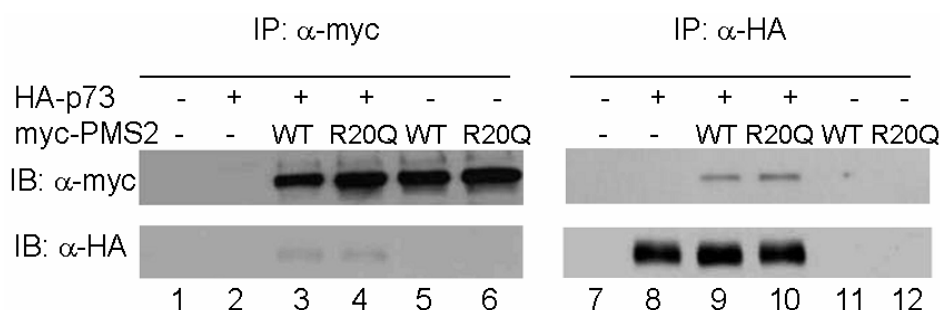
**2.12. Statistička analiza:** Za test izlučivanja tripan plavila, te sub-G1 mjerenje, statistička značajnost ispitana je testovima analiza varijance za ponovljena mjerenja (eng. *Repeated measurement analysis of variance*), te

analiza varijance (eng. *Analysis of variance*) za svaku točku mjerenja (WinStat). Analiza varijance korištena je za test klonskog preživljavanja i test izlučivanja propidij jodida.

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Cisplatina ne pojačava interakciju proteina PMS2-R20Q i p73

Poznato je da cisplatina stimulira interakciju proteina PMS2 i p73 (33). U ko-immunoprecipitacijskom eksperimentu s anti-myc protutijelom, u stanicama bez prethodnog tretmana cisplatinom, detektirana je velika količina myc-PMS2 i myc-PMS2-R20Q i znatno manja količina HA-p73 $\alpha$  proteina (Slika 8, linije 3 i 4). U recipročnoj precipitaciji s anti-HA protutijelom, detektirane su male količine myc-PMS2 i myc-PMS2-R20Q proteina (Slika 9, linije 9 i 10). Prema tom nalazu može se zaključiti da je PMS2-R20Q protein zadržao sposobnost stvaranja kompleksa s p73 u nestimuliranoj stanici.

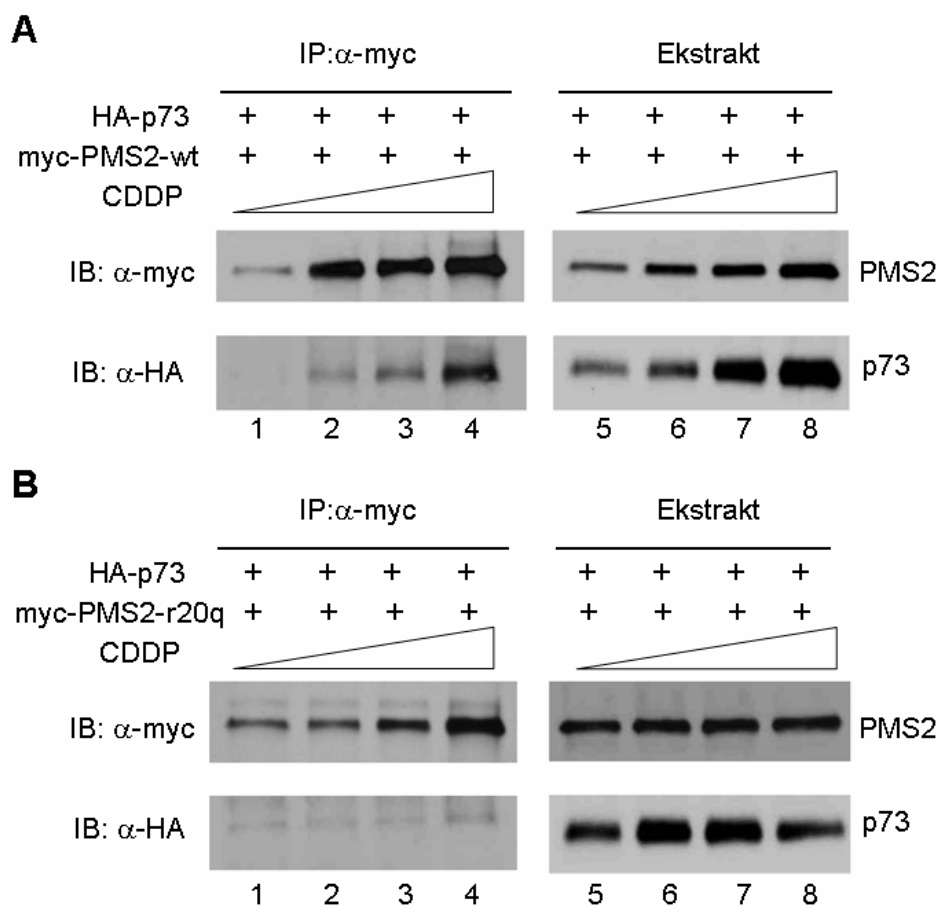


**Slika 9.** Bazalna interakcija PMS2 i PMS2-R20Q s p73.

Myc peptidom označen PMS2 (wt ili R20Q), te HA peptidom označen p73 $\alpha$ , zajednički su eksprimirani u HEK 293T stanicama. Imunoprecipitirani su pomoću anti-myc ili anti-HA protutijela, te analizirani imunoblot tehnikom pomoću anti-myc i anti-HA protutijela.

Da bismo ispitali je li ova interakcija stimulirana djelovanjem cisplatine (Slika 10), transfecirane stanice stimulirali smo tijekom 24h s različitim koncentracijama cisplatine: 0  $\mu$ M/L (linije 1, 5); 12.5  $\mu$ M/L (linije

2,6); 25  $\mu\text{M/L}$  (linije 3,7) ili 50  $\mu\text{M/L}$  (linije 4,8). Potom pripremljeni stanični lizat podvrgnut je imunoprecipitaciji s anti-myc protutijelom.



**Slika 10.** Utjecaj cisplatine na interakciju PMS2 s MLH1 ili p73.

Ekspresijski plazmidi za HA-p73 i myc-PMS2-wt (A) ili myc-PMS2-R20Q (B) zajedno su izraženi u 293T stanicama. Stanice su tretirane s 0  $\mu\text{M/L}$  (linije 1;5), 12.5  $\mu\text{M/L}$  (linije 2;6), 25  $\mu\text{M/L}$  (linije 3;7), ili 50  $\mu\text{M/L}$  CDDP (linije 4;8) tijekom 24h. Stanični lizati su imunoprecipitirani pomoću anti-myc protutijela, te analizirani pomoću anti-myc i anti-HA protutijela

U stanicama s izraženim myc-PMS2, utvrđeno je da nivo p73 proteina raste sukladno porastu koncentracije cisplatine (Slika 10A, linije 5-8), kao što i nivo p73 u anti-myc imuno-kompleksu raste sukladno porastu koncentracije cisplatine (Slika 10A, linije 1-4). Već prije je pokazano da porast nivoa

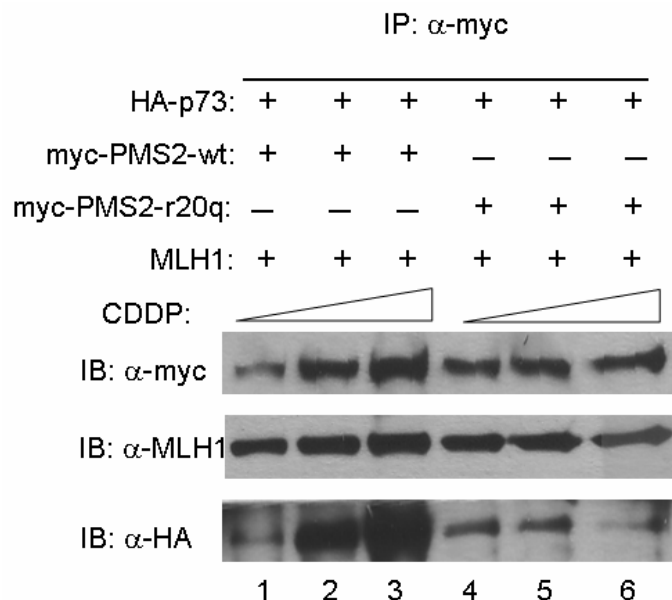


proteina u ko-immunoprecipitaciji nije posljedica jednostavnog porasta nivoa proteina u stanici, već je odraz pojačanog povezivanja PMS2 i p73 nakon tretmana cisplatinom (33). U stanicama s izraženom myc-PMS2-R20Q varijantom, nije zapažena povećana asocijacija PMS2 i p73 (Slika 10B, linije 1-4), niti je opažen porast nivoa p73 kao odgovor na tretman cisplatinom (Slika 10B, linije 5-8). Ovakav rezultat pokazuje da je, o dozi ovisan, učinak cisplatine na pojačano udruživanje PMS2 i p73 oštećen kod R20Q varijanta PMS2 proteina.

Također smo ispitivali interakciju PMS2 i MLH1 u odgovoru na djelovanje cisplatine (Slika 11). Stanice kotransfecirane s MLH1, HA-p73 i myc-PMS2 ili myc-PMS2-R20Q podvrgnute su djelovanju cisplatine u koncentraciji od 0  $\mu$ M/L (linije 1, 4); 25  $\mu$ M/L (linije 2, 5) ili 50  $\mu$ M/L (linije 3, 6) tijekom 24 sata. Nakon toga, stanični lizati podvrgnuti su imunoprecipitaciji s anti-myc protutijelom. Imuni kompleksi detektirani su anti-myc, anti-HA i anti-MLH1 protutijelima (Slika 11).

Približno ista količina MLH1 proteina detektirana je u imunokompleksima iz stanica s izražajem myc-PMS2 i myc-PMS2-R20Q, a nivo MLH1 proteina u kompleksu nije se mijenjao ovisno o djelovanju cisplatine (Slika 11, srednja pruga). Za razliku od toga, nivo imunoprecipitiranog HA-p73 proteina povećavao se sukladno povećanju koncentracije cisplatine, ali samo u stanicama s izražajem myc-PMS2, ali ne i myc-PMS2-R20Q. (Slika 11, donja pruga). Tijekom daljnjih eksperimenata nismo uspjeli dokazati postojanje PMS2, MLH1 i p73 proteine u zajedničkom proteinskom kompleksu. Iz ovih rezultata možemo zaključiti da PMS2/MLH1 kompleks nije podložan djelovanju cisplatine, dok cisplatina na PMS2/p73 kompleks ima stimulativan učinak. Međutim,

stimulacija cisplatinom na PMS2/p73 kompleks izostaje kod PMS2-R20Q varijante.



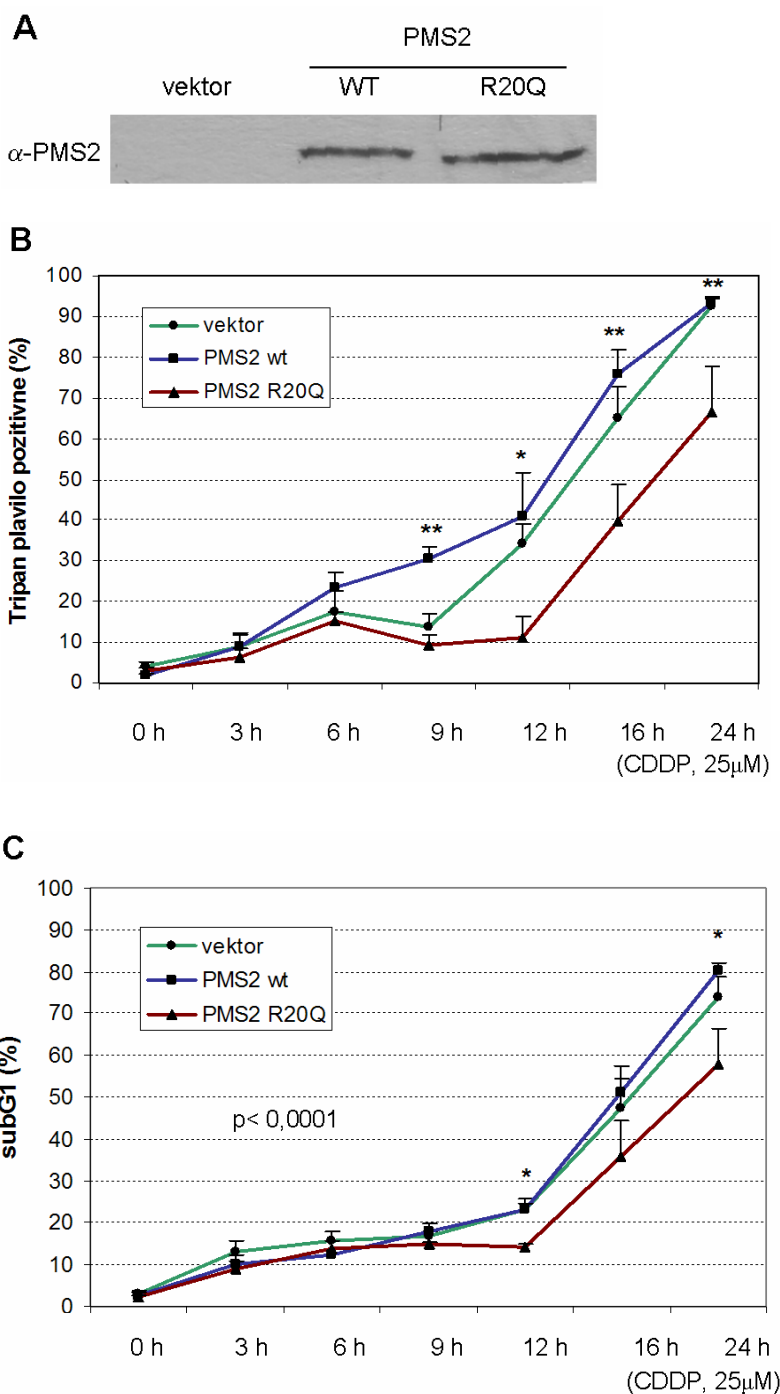
**Slika 11.** Cisplatina ne utječe na interakciju MLH1 s PMS2 i s PMS2-R20Q.

293T stanice transfecirane su s navedenim plazmidima, izložene su djelovanju cisplatine od 0  $\mu$ M/L (linije 1 i 4), 25  $\mu$ M/L (linije 2 i 5) ili 50  $\mu$ M/L (linije 3 i 6) tijekom 24h. Stanični lizati su imunoprecipitirani pomoću anti-myc protutijela, te analizirani imunoblot tehnikom pomoću anti-myc, anti-MLH1 i anti-HA protutijela.

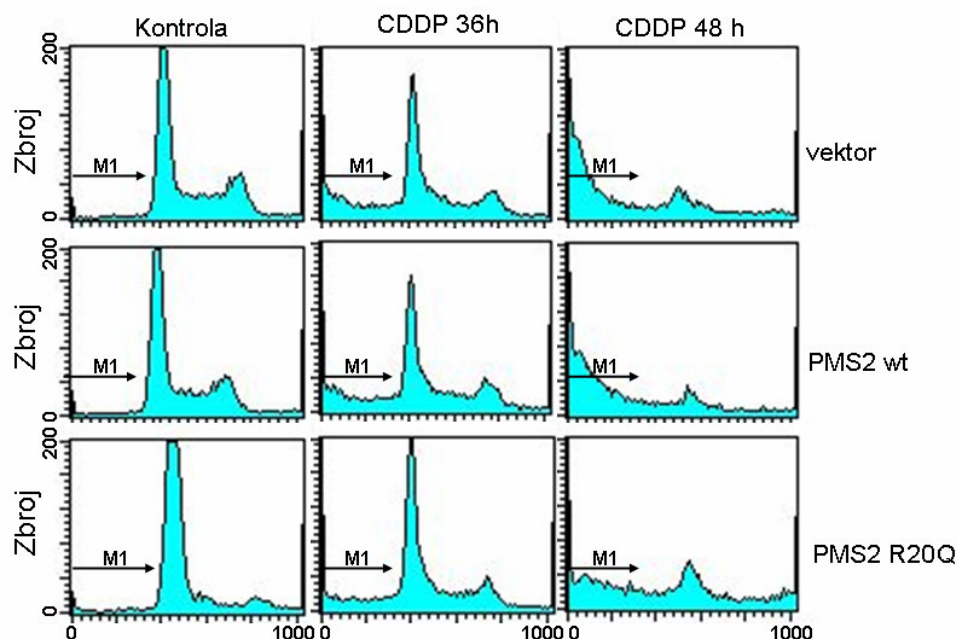
### 3.2 Defekt PMS2-R20Q u aktivaciji stanične smrti nakon oštećenja DNA cisplatinom

Zbog spoznaje da cisplatina ne pojačava interakciju između PMS2-R20Q i p73, a znajući da je PMS2 neophodan za aktivaciju apoptotske funkcije p73 nakon oštećenja DNA cisplatinom (33), usporedili smo utjecaj izražaja PMS2 ili PMS2-R20Q na apoptotski odgovor nakon

tretmana cisplatinom. U PMS2 deficijntnim mišjim embrionalnim fibroblastima (MEF *Pms2* <sup>-/-</sup>), prijenosom gena pomoću retrovirusnog vektora, izazvali smo stabilan izražaj humanog PMS2 ili humanog PMS2-R20Q proteina (Slika 12A).



**D**



**Slika 12.** Reducirani apoptotski odgovor na cisplatinu kod stanica s PMS2-R20Q.

A) Razina PMS2 proteina u c18.2 *Pms2*-deficijentnim MEF stanicama u koje je ubačen vektor (vektor), humani PMS2 (WT) ili humani PMS2-R20Q (R20Q). Podjednake količine lizata analizirane su u svakoj liniji.

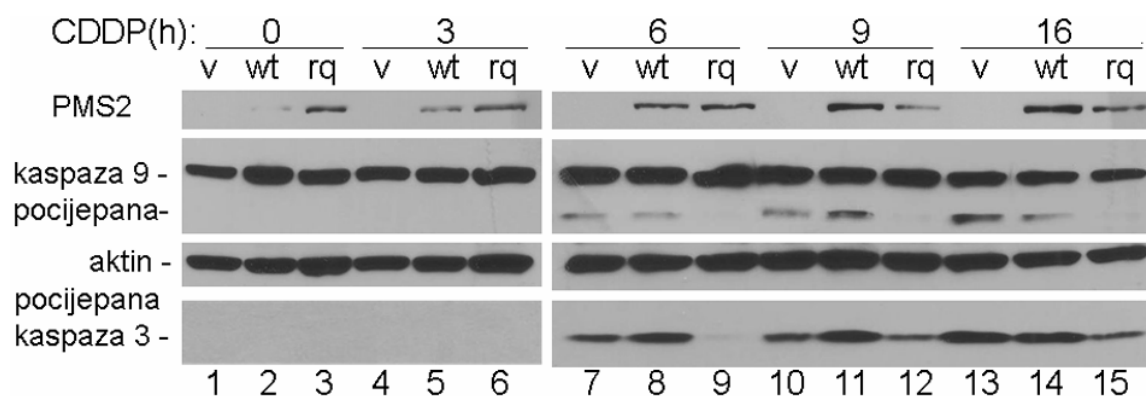
B / C / D) Praćenje aktivacije stanične smrti.

Navedene stanične linije, prethodno tretirane cisplatinom (25  $\mu$ M/L CDDP tijekom 24h), oprane su hranjivim medijem i ponovno izložene cisplatinu (25  $\mu$ M/L CDDP) tijekom dodatnih 3, 6, 9, 12, 16 ili 24h (kako je navedeno). Kontrolni uzorci nisu tretirani cisplatinom i označene su kao 0h. Vitalnost stanica ispitana je testom izlučivanja tripan plavila (B), te određivanjem sub-G1frakcije (C). Prikazane srednje vrijednosti i standardna pogreška rezultat su triju neovisnih pokusa, s po tri ponavljanja za svaku ispitivanu točku mjerenja i tip stanica. D) Histogramski prikaz sub-G1 testaa. CDDP 36h i CDDP 48h: kumulativno vrijeme djelovanja cisplatine (24h+16h odnosno 24h+24h). Statistička značajnost \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ .

Stanice su izložene djelovanju cisplatine, a stanična smrt mjerena je pomoću dvije metode: testom izlučivanjem tripan plavila (Slika 12B) i mjerenjem sadržaja kromatina pomoću protočne citometrije (SubG1 DNA content) (Slika 12C, 12D). Produženo djelovanje cisplatine (>36h)

izaziva staničnu smrt Pms2-deficijentnih mišjih fibroblasta, što kazuje da postoji i PMS2 neovisan put aktivacije stanične smrti kao odgovor na cisplatinu. Izražaj PMS2 nije značajno promijenio odgovor stanične smrti izazvan cisplatinom (Slika 12B, 12C). U isto vrijeme, izražaj PMS2-R20Q proteina uzrokovao je značajno smanjenje odumiranja stanica, što je zabilježeno testom izlučivanja tripan plavila (u svim točkama mjerenja, Slika 12B), kao i mjerenjem SubG1 uz pomoć protočne citometrije (u dvije točke mjerenja). Također, statistički test „ANOVA s ponovljenim mjerenjima“ za SubG1 analizu potvrdila je reduciranu aktivaciju stanične smrti PMS2-R20Q stanične linije ( $p < 0.0001$ ) (Slika 12C).

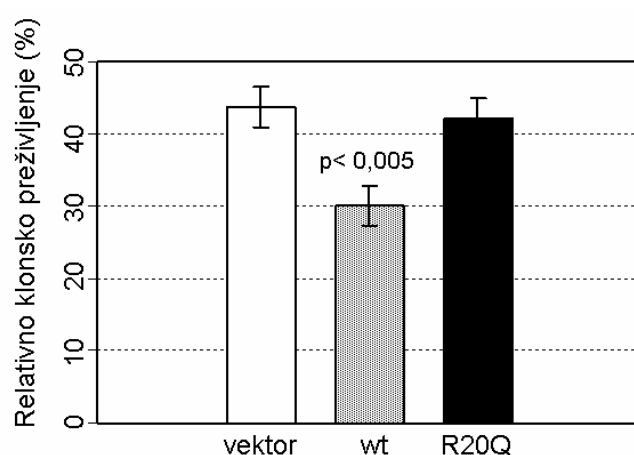
Oštećenje DNA pokreće apoptotski put, koji uključuje cijepanje i aktivaciju inicijatorske kaspaze-9 i efektorske kaspaze-3 (44). Da bismo ispitali cijepanje kaspaza, stanice smo izložili djelovanju cisplatine tijekom 24 sata, isprali i dodali svježi hranjivi medij, te lizirali nakon narednih 3, 6, 9 ili 16 sati. Stanične lizate podvrgnuli smo imunoblot analizi koristeći protutijela protiv kaspaze-9 i pocijepane kaspaze-3 (Slika 13).



**Slika 13.** Cijepanje kaspaza.

Navedena stanična populacija (v, vektor; wt, PMS2; rq, PMS2-R20Q) izložena je djelovanju 25  $\mu\text{M/L}$  CDDP. Stanice su žrtvovane u navedenim točkama mjerenja, a ukupni stanični lizat analiziran je imunoblot tehnikom za kaspazu 9, pocijepanu kaspazu 3, te  $\beta$ -actin kao kontrolu količine uzorka.

Cijepanje kaspaza 9 i 3 zabilježeno je između 3 i 6 sati nakon promjene hranjivog medija u stanicama s izražajem humanog PMS2 ili onima bez izražaja PMS2 proteina, ali ne i u stanicama s PMS2-R20Q (Slika 13, linije 7-9). U svim ispitivanim točkama od 6 do 16 sati nakon dodavanja svježeg hranjivog medija, stanice s izraženim PMS2-R20Q proteinom pokazale su slabije cijepanje kaspaza u usporedbi s PMS2 ili „vektor” staničnom linijom (Slika 13, linije 7-15).



<i>Esej klonskog preživljenja</i>	PMS2-/- (vektor)	PMS2 - wt	PMS2 - R20Q
Broj kolonija netretiranih - kontrola (sred.vr. ± st. pogreška)	61,8 ± 9,9	69,5 ± 10,8	67,8 ± 8,4
Broj kolonije preživjelih nakon CDDP (sred.vr. ± st. pogreška)	<b>25,2 ± 4,2</b>	<b>19,1 ± 3,3</b>	<b>26,9 ± 8,4</b>

**Slika 14.** PMS2 ali ne i PMS2-R20Q reducira klonsko preživljavanje nakon djelovanja cisplatine.

Navedene stanične populacije nasijane su u koncentraciji od 200 stanica u posudi. Idući dan tretirane su cisplatinom u koncentraciji od 8  $\mu$ M/L tijekom 1h, ili 0  $\mu$ M/L (kontrola). Nakon što su stanice isprane hranjivim medijem tri puta, uzgajane su narednih deset dana, a preživjele kolonije prebrojane su nakon fiksacije metanolom i bojanja kristal-violet bojom. Postotak kolonijskog preživljenja izračunat je kao broj kolonija u cisplatinom tretiranim zdencima podijeljen s brojem kolonija u netretiranim, kontrolnim zdencima. Prikazani podaci rezultat su četiriju neovisnih eksperimenata, s triplikatima za svaki genotip po eksperimentu.

Ovakav rezultat pokazuje da PMS2-R20Q eksprimiran u MEF *Pms2*<sup>-/-</sup>, ima negativan učinak na cisplatinom potaknuto cijepanje kaspaza-9 i -3, a izražaj humanog PMS2 proteina u istoj staničnoj liniji ne dovodi do značajnog pojačanja apoptotskog odgovora na cisplatinu.

Da bismo usporedili dugotrajan učinak PMS2 i PMS2-R20Q proteina, proveli smo test Klonskog preživljenja (Slika 14). Stanice su izložene tijekom jednog sata djelovanju subletalne koncentracije cisplatine (8  $\mu$ M) ili samom otapalu kao kontroli, isprane s hranjivim medijem i uzgajane narednih deset dana. Nakon fiksiranja i bojanja, prebrojane su formirane kolonije i izračunat je postotak kolonijskog preživljenja kao kvocijent broja kolonija u posudi tretiranoj s cisplatinom i broja kolonija u kontrolnoj posudi (Slika 14):

$$\text{Relativno klonsko preživljenje (\%)} = \frac{\text{Broj kolonija u posudi s cisplatinom}}{\text{Broj kolonija u kontrolnoj posudi}} \times 100$$

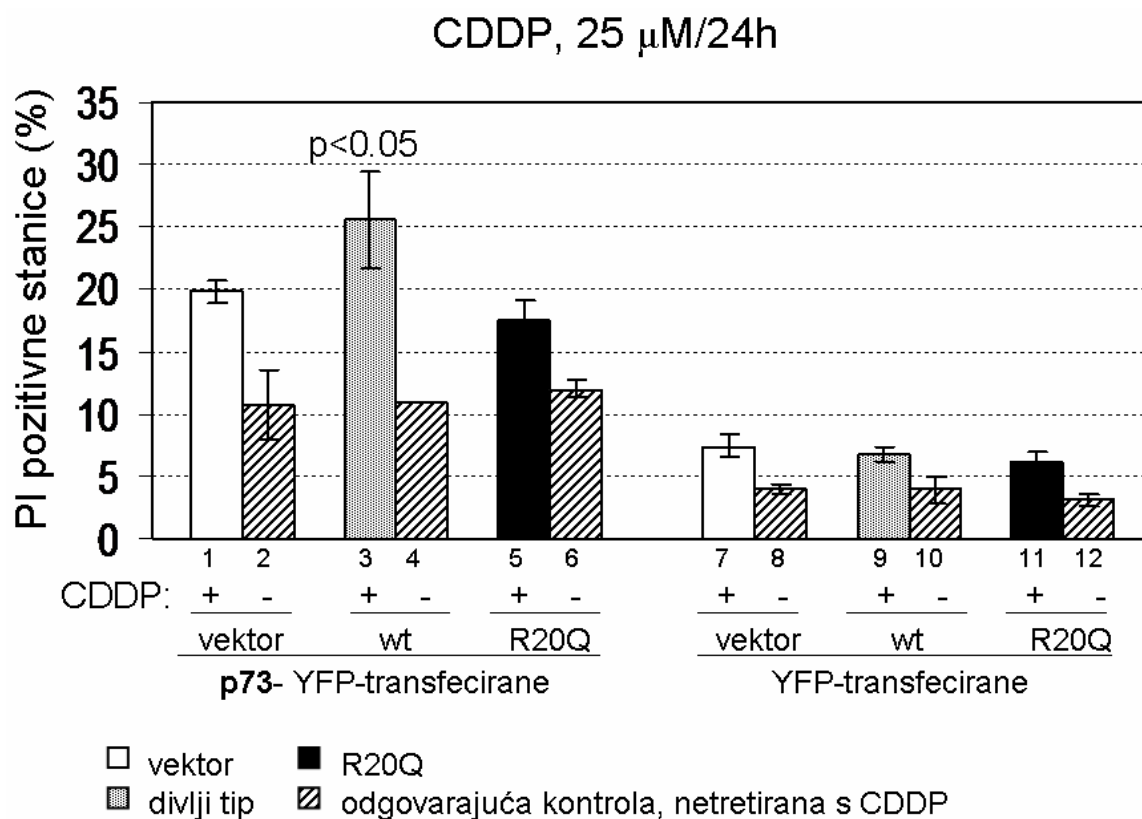
Postotak uspješnog presijavanja *Pms2*<sup>-/-</sup> MEF stanica bio je između 30-35%. Nakon tretmana cisplatinom, između 12-15% stanica je preživjelo i formiralo kolonije. Izražaj PMS2 snizio je postotak uspješnog presijavanja na manje od 10% ( $p < 0.005$ ), dok izražaj PMS2-R20Q nije imao učinka na preživljavanje MEF stanica. Ovaj rezultat govori nam da PMS2 senzibilizira stanice na djelovanje cisplatina, dok PMS2-R20Q ovaj učinak nema.

### 3.3. Defekt odgovora PMS2-R20Q postoji i nakon pojačanog izražaja proteina p73

*Pms2*<sup>-/-</sup> MEF stanice sadrže 5 do 15 kopija glasničke RNA (mRNA) za p73 protein u svakoj stanici, što je određeno „lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu” (RT-PCR). Budući je nivo proteina p73 u mišjim fibroblastima 3T3 vrlo nizak, detekcija mišjeg p73 $\alpha$  imunoblot tehnikom nije bila uspješna. Samim time, nismo uspjeli ispitati utjecaj PMS2 ili PMS2-R20Q na endogeni p73, čija bi aktivacija putem PMS2, ali ne i PMS2-R20Q proteina mogla doprinijeti različitosti apoptotskog odgovora *Pms2*<sup>-/-</sup> MEF stanica u testu klonskog preživljenja. Postoji mogućnost da endogeni p73 protein nije izražen u *Pms2*<sup>-/-</sup> MEF stanicama, a PMS2 protein potiče apoptozu nakon oštećenja cisplatinom nekim alternativnim putem, koji ne uključuje p73. Da bi isključili mogućnost ograničenja apoptotskog staničnog odgovora na cisplatinu zbog manje količine p73 proteina u ovom tipu stanica, testirali smo hoće li pojačan izražaj ektopičnog p73 proteina utjecati na apoptotski odgovor na cisplatinu u tim stanicama.

*Pms2*<sup>-/-</sup> MEF stanice s ekspresijom triju genotipova: vektor, PMS2 ili PMS23-R20Q, transfecirane su plazmidom sa samo YFP ili p73-YFP proteinom, tretirane cisplatinom (25  $\mu$ M/L tijekom 24h) ili otapalom-DMSO (kontrola), te je pomoću FACS protočne citometrije mjereno izlučivanje propidij jodida iz stanica pozitivnih na fluorescenciju žutog proteina (YFP) (Slika 15).





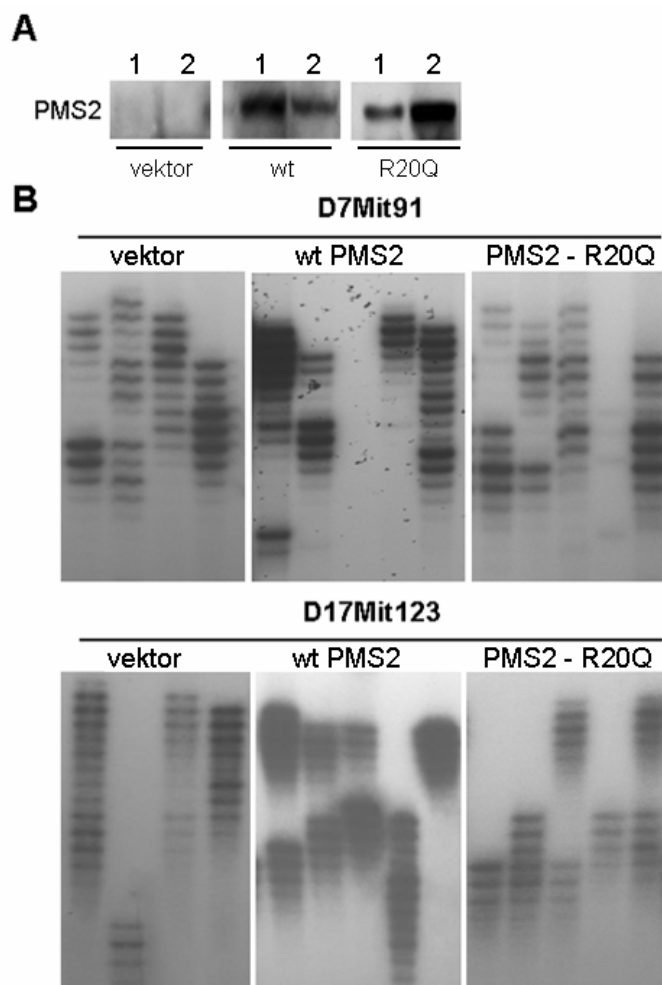
**Slika 15.** Procjena utjecaja povećane količine p73 na cisplatinom izazvanu staničnu smrt. c18.2 stanice transfecirane su pEYFP-p73 plazmidom (stupci 1-6), ili „praznim” pEYFP plazmidom (Stupci 7-12). Nakon 24h, stanice su izložene djelovanju 25  $\mu$ M/L CDDP tijekom 24h, ili 0  $\mu$ M/L CDDP (kontrolne stanice). Stanice su zatim obojane propidij jodidom i unutar 30 minuta mjereno je izlučivanje boje iz stanice pomoću FacsCalibur protočnog citometra. Samo YFP pozitivne stanice uključene su u mjerenje. Rezultat prikazuje četiri neovisna eksperimenta, a svaka kombinacija genotipova i transfekcija napravljena je u duplikatu.

Sukladno već poznatim nalazima (33, 42), pojačan izražaj p73 proteina povećao je odumiranje stanica čak i bez djelovanja cisplatinu (Slika 15, usporedi stupce 2, 4, 6 sa stupcima 8, 10, 12). Isto tako, ekspresija YFP-p73 proteina ubrzala je odumiranje stanica nakon djelovanja cisplatinu, tako da je značajan udio mrtvih stanica detektiran već 24 sata nakon početka djelovanja cisplatinu (Slika 15, usporedi stupce 1, 3, 5 sa stupcima 7, 9, 11). Odumiranje stanica zbog djelovanja cisplatinu opaženo je i u stanicama bez PMS2 (vektor – stanična linija), što nam svjedoči da pro-apoptotska

aktivnost p73 može biti aktivirana i nekim mehanizmima neovisnom o PMS2. U stanicama s izražajem PMS2, stanična smrt izazvana cisplatinom značajno je porasla u stanicama u koje je ubačen YFP-p73, ali ne i u onima u koje je ubačen YFP (Slika 15, usporedi stupce 3 i 9), što je u skladu sa zaključkom da PMS2 doprinosi aktivaciji p73 nakon oštećenja cisplatinom (33). Cisplatinom izazvana stanična smrt ovisna o aktivaciji p73 uz pomoć PMS2, nije porasla u stanicama s izražajem PMS2-R20Q (Slika 15, usporedi stupce 1 i 5). Ovaj rezultat podržava zaključak da je PMS2-R20Q defektan u prijenosu signala o oštećenju DNA do p73 proteina.

#### **3.4. Humani PMS2 i PMS2-R20Q proteini nisu korigirali pogrešno sparivanje baza u mišjim *Pms2* $-/-$ stanicama**

Pokazano je da humani PMS2 protein nije u stanju korigirati MMR defekte u mišjim *Pms2*  $-/-$  stanicama (45). Potvrdili smo ovu činjenicu u stanicama rekonstruiranim s retrovirusnim vektorom, humanim PMS2 ili humanim PMS2-R20Q proteinom (Slika 16). Pojedinačne stanice uzgajane su do formiranja kolonije, a zatim su, koristeći genomsku DNA u vrlo niskoj koncentraciji, analizirana dva mikrosatelitska markera. Rezultati su pokazali da stanice s izražajem bilo PMS2 ili PMS2-R20Q proteina pokazuju sličnu mikrosatelitsku nestabilnost kao i stanice bez PMS2 (vektor) (Slika 16).



**Slika 16.** Test mikrosatelitske nestabilnosti (MSI) za dva markera dinukleotidnih ponavljanja D7Mit91 i D17Mit123.

A) Nivo PMS2 proteina u kolonijama (klonovima) nastalim iz jedne stanice linije c18.2 PMS2<sup>-/-</sup>. Vektor: stanice s ubačenim praznim plazmidom (bez PMS2); wt: stanice s divljim tipom PMS2; R20Q: stanice s ubačenim PMS2-R20Q proteinom. Za svaki genotip izolirana je DNA iz dvaju (1 i 2) kolonija. B) MSI na D7Mit91 i D17Mit123 dinukleotidnim markerima. Sve stanične linije pokazuju značajnu MSI. Slika predstavlja reprezentativni dio gela.

## 4. RASPRAVA

Genetski polimorfizam je čimbenik koji doprinosi fenotipskoj različitosti ljudske populacije. S kliničkog aspekta, važno je poznavanje utjecaja polimorfnih alela na uzrok ili liječenje neke bolesti; takvo znanje neophodno je za razvoj personalizirane medicine. Stupanj polimorfizma među humanim genima vrlo je varijabilan i vjerojatno ovisi o funkciji gena, te selektivnom utjecaju okoline na tu funkciju. U ovoj smo studiji ispitali nekoliko varijanti humanog gena PMS2, koji je izrazito polimorfan gen, i pronašli smo jednu varijantu koja uzrokuje defekt u poticanju apoptotskog odgovora stanice na cisplatinu. Bilo bi korisno u budućem radu odrediti je li PMS2-R20Q varijanta koja je zastupljena u oko 10% populacije (43), povezana s povećanom otpornošću na cisplatinu kao antineoplastični lijek kod pacijenata s karcinomima.

Gen Pms2 kodira MutL-homologni protein uključen u popravak pogrešno sparenih baza (38). PMS2 protein veže se s MLH1, formirajući tako heterodimerni kompleks MutL $\alpha$ , koji se povezuje s MutS $\alpha/\beta$  i aktivira popravak pogrešno sparenih baza, te malih insercijskih ili delecijских lezija koje nastaju tijekom DNA replikacije (46). Nasljedne mutacije MLH1 ili epigenetsko utišavanje njegovog izražaja, povezani su s razvojem brojnih vrsta tumora (47, 48). Mutacije u PMS2 genu manje su učestale nego mutacije nekih drugih MMR gena, ali su pronađene kod HNPCC, te Turcot sindroma (17, 19, 49). Tumor supresijska funkcija MutL $\alpha$  pripisuje se činjenici da je neophodan za odvijanje funkcije MMR sustava (10). Tumor supresijska funkcija PMS2 u MutL $\alpha$  povezana je s njegovom važnom

ulogom u procesu popravka DNA (10). Izgledno je i da sposobnost aktivacije apoptoze i kontrolne točke staničnog ciklusa doprinose tumor supresijskoj funkciji heterodimera MutL $\alpha$  (29). Spoznaja da varijanta R20Q proteina PMS2 (za razliku od divljeg oblika proteina) nije sposobna stabilizirati protein p73, koji je važan pokretač apoptoze, upućuje na mogućnost da ta, u populaciji relativno učestala varijanta proteina PMS2, možda doprinosi razvoju tumora i/ili otpornosti na neke protutumorske lijekove, npr. Cisplatinu.

Isto tako, regulacija kontrolne točke staničnog ciklusa ovisi o MutL $\alpha$ , te možda također doprinosi tumorskoj supresiji (29). Mehanizam koji je u podlozi proapoptotskoj aktivnosti MMR proteina i njegova povezanost s MMR proteinima još uvijek je nerazjašnjen. Genetski dokazi da se funkcije popravka DNA i proapoptotska funkcija MSH2 ili MSH6 mogu razdvojiti specifičnim supstitucijskim mutacijama, upućuju na to da ove dvije biološke funkcije možda zahtijevaju dvije različite konformacije MutS $\alpha$  kompleksa (30, 31). Otkrili smo da je PMS2-R20Q varijanta zadržala sposobnost vezivanja MLH1 proteina, ali je izgubila sposobnost aktivacije p73, što je u skladu s teorijom da se proapoptotska funkcija i MMR funkcija MutL $\alpha$  kompleksa mogu razdvojiti. Vezujući se za protein p73, PMS2 ga aktivira i u slučaju oštećenja cisplatinom potiče apoptotski odgovor neovisno o bjelančevini p53 (33).

Naši rezultati sugeriraju da se PMS2-MLH1 i PMS2-p73 interakcije međusobno isključuju. Kompleks PMS2-MLH1, MutL $\alpha$ , stimulira popravak DNA i aktivira ATR kinazu (29). Od prije je poznato da PMS2-p73 kompleks stimulira apoptozu (33). Zanimljivo je da nakon izlaganja cisplatinu PMS2-p73 interakcija jača, dok PMS2-MLH1 ostaje

nepromijenjena. Zbog činjenice da učinak cisplatine ciljano djeluje na PMS2-p73 interakciju i zato što nismo uspjeli detektirati kompleks u kom su PMS2-p73-MLH1 istovremeno, vrlo je izgledno da PMS2 može pristupiti dvama različitim proteinskim kompleksima: jednom u kome je MLH1 i drugom u kome je p73. Prema ovom modelu, PMS2-R20Q varijanta imala bi, nakon izlaganja cisplatinu, defekt u prebacivanju s jednog kompleksa na drugi.

Arginin na poziciji 20 (R20) nije konzerviran u PMS2 proteinu miša ili kvasnica. Prema kristalnoj strukturi N-terminalnog fragmenta humanog PMS2 proteina veličine 40 Kd (Slika 6) (50), R20 nalazi se u L1 strukturi nepravilne petlje, koja je N-terminalno od filogenetski izuzetno sačuvane ATP-azne domene, koja se može naći u MutL homolozima prokariotskih i eukariotskih stanica. Usporedbom s kristalnom strukturom bakterijskog MutL homo-dimera (51), nepravilna L1 petlja vjerojatno modificira interakciju PMS2 i MLH1.

Budući da asocijacija PMS2 i MLH1 nije narušena, moguće je da R20Q narušava disocijaciju PMS2 od MLH1, te na taj način, nakon tretmana cisplatinom, interferira sa stvaranjem alternativnog kompleksa između PMS2 i p73. Za razliku od bakterijskog MutL proteina, PMS2 sisavaca i u monomernom obliku zadržava ATP-aznu aktivnost u N-terminalnoj domeni (50), što nam govori da PMS2 možda prolazi kroz konformacijsku izmjenu ATP/ADP bez MLH1. U tom slučaju, nakon interakcije s MSH2-MSH6 kompleksom, vezanim na cisplatinu i unakrsno povezanu DNA, PMS2 iz MutL $\alpha$  disocira od MLH1 i kao monomer – aktivira p73. Budući je monomerni PMS2 vrlo nestabilan (40, 41), stvaranje PMS2-p73 kompleksa vjerojatno zahtjeva još neke faktore, koji se tek trebaju identificirati. Za pretpostaviti je da bi navedena otkrića mogala

imati i medicinske aplikacije jer dovode do poremećaja apoptotskog odgovora (koji je važan mehanizam uništavanja promijenjenih stanica) te otpornosti malignog tkiva na cisplatinu. Za pretpostaviti je da će testiranje na R20Q varijantu proteina PMS2 biti sastavni dio genetskog savjetovanja ili dio dijagnostičke procedure prije određivanja adekvatne anti-tumorske terapije, a za što su potrebna prikladna klinička testiranja.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Varijanta protein PMS2-R20Q, koja je zastupljena u oko 10% populacije, ne potiče aktivaciju apoptoze ovisne o proteinu p73 nakon oštećenja molekule DNA cisplatinom.
2. Varijanta PMS2-R20Q ima održanu interakciju s proteinima MLH1 i p73 u nestimuliranim uvjetima. Nakon oštećenja DNA cisplatinom, kod stanica s izražajem PMS2-R20Q izostaje o dozi ovisan učinak cisplatine na pojačano udruživanja PMS2 i p73.
3. Protein PMS2-R20Q eksprimiran u MEF *Pms2*<sup>-/-</sup> ima negativan učinak na cisplatinom potaknuto cijepanje kaspaza -9 i -3.
4. R20Q varijanta proteina PMS2 uzrok je redukcije aktivacije stanične smrti u odgovoru na djelovanje cisplatine.
5. Izostanak poticanja apoptoze putem proteina p73 kod varijante PMS2-R20Q nakon oštećenja cisplatinom mogao bi imati medicinske aplikacije u razvijanju otpornosti na citostatsku terapiju.



## 6. SAŽETAK

Popravljači pogrešno sparenih baza (MMR) obavljaju popravak replikacijskih pogrešaka nastalih tijekom DNA sinteze. Isto tako, MMR proteini kod sisavaca imaju sposobnost aktivacije kontrolne točke staničnog ciklusa, te pokretanja apoptoze kao odgovora na nepopravljivo oštećenje DNA. Stanice s manjkavošću MMR sustava otporne su na djelovanje cisplatine – kemoterapeutika koji uzrokuje interlančano, unakrsno povezivanje nukleotida, i to zbog poremećene aktivacije apoptotskog puta. Od prije je poznato da je PMS2 protein, jedan od proteina iz MMR skupine, neophodan za aktivaciju proteina p73 nakon oštećenja DNA cisplatinom. Protein p73 je član porodice p53, s kojim dijeli proapoptotsku aktivnost. Humani PMS2 protein je izrazito polimorfan; definirano je barem dvanaest zamjena aminokiselina. U ovom radu pokazali smo defekt varijante R20Q-PMS2 u poticanju apoptotskog odgovora na cisplatinu putem aktivacije proteina p73. Kada je izražen u mišjim fibroblastima bez endogenog PMS2 proteina, varijanta R20Q-PMS2, u usporedbi s divljim tipom proteina PMS2, izaziva slabiji apoptotski odgovor na cisplatinu. Isto tako, citotoksični učinak cisplatine, mjereno testom klonskog preživljenja, pojačan je kod PMS2, ali ne i kod PMS2-R20Q. Budući je kod PMS2-R20Q oštećena proapoptotska aktivnost, ovaj varijanta PMS2 proteina možda ima ulogu u moduliranju tumorskog odgovora na cisplatinu kod liječenja pacijenata sa zloćudnim tumorima.

## 7. SUMMARY

Mismatch repair (MMR) corrects replication errors during DNA synthesis. The mammalian MMR proteins also activate cell cycle checkpoints and apoptosis in response to persistent DNA damage. MMR-deficient cells are resistant to cisplatin - a DNA crosslinking agent used in chemotherapy, due to impaired activation of apoptotic pathways. It is previously shown that PMS2, an MMR protein, is required for cisplatin-induced activation of p73, a member of the p53-family with pro-apoptotic activity. The human PMS2 gene is highly polymorphic; at least twelve nonsynonymous codon changes have been identified. We show here that the PMS2-R20Q variant is deficient in activating p73-dependent apoptotic response to cisplatin. When expressed in *Pms2*-deficient mouse fibroblasts, human PMS2-R20Q, but not PMS2, reduced the apoptotic response to cisplatin. Correspondingly, the cytotoxic effect of cisplatin, measured by clonogenic survival, is enhanced by PMS2 but not PMS2-R20Q. Because PMS2-R20Q lacks the pro-apoptotic activity, this PMS2-polymorphic allele may play a role in modulating the tumor response to cisplatin among cancer patients.

## 8. ETIČKA NAČELA

Istraživanje je napravljeno na *University of California San Diego*, u laboratoriju Prof. dr. sc. Jean YJ Wang. U svim testovima korištene su stanične linije, dok ispitanici i laboratorijske životinje nisu korišteni u tijeku izrade ove disertacije. Poštovana su opća etička načela i principi zajednički svim istraživanjima koja se provode na Kalifornijskom Sveučilištu, San Diego (University of California, San Diego; USA).

## 9. POPIS LITERATURE

1. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 2008;18:85-98.
2. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer.* 2003;3:339-49.
3. Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst).* 2004;3:1091-101.
4. Ishikawa K, Ishii H, Saito T. DNA damage-dependent cell cycle checkpoints and genomic stability. *DNA Cell Biol.* 2006;25:406-11.
5. Wang J-Y, Cho S-K. Coordination of repair, checkpoint, and cell death responses to DNA damage. *Adv Protein Chem.* 2004;69:101-35.
6. Usui T, Petrini J-H, Morales M. Rad50S alleles of the Mre11 complex: questions answered and questions raised. *Exp Cell Res.* 2006;312:2694-9.
7. Yang W. Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat Res.* 2000;460:245-56.
8. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:335-46.
9. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:307-20.
10. Jun SH, Kim TG, Ban C. DNA mismatch repair system: Classical and fresh roles. *FEBS J.* 2006;273:1609-19.
11. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10:735-40.

12. Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA. Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. *Environ Mol Mutagen.* 2004;44:249-64.
13. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures, Special edition.* Atlanta: American Cancer Society; 2005.
14. Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003;138:560-70.
15. Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, Genuardi M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet A.* 2003;122:325-34.
16. Peltomaki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer.* 2005;4:227-32.
17. De Rosa M, Fasano C, Panariello L, Scarano MI, Belli G, Iannelli A, et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene.* 2000;19:1719-23.
18. Gryfe R, Gallinger S. Germline PMS2 mutations: one hit or two? *Gastroenterology.* 2005;128:1506-9.
19. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 1995;332:839-47.
20. Duckett DR, Drummond JT, Murchie AI, Reardon JT, Sancar A, Lilley DM, et al. Human MutS $\alpha$  recognizes damaged DNA base pairs containing O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>4</sup>-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:6443-7.

21. Mello JA, Acharya S, Fishel R, Essigmann JM. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol.* 1996;3:579-89.
22. Ni TT, Marsischky GT, Kolodner RD. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxoguanine in *S. cerevisiae*. *Mol Cell.* 1999;4:439-44.
23. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:573-84.
24. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22:7265-79.
25. Nehme A, Baskaran R, Aebi S, Fink D, Nebel S, Cenni B, et al. Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res.* 1997;57:3253-7.
26. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* 1996;56:3087-90.
27. Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, et al. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 1997;57:1841-5.
28. Wu X, Platt JL, Cascalho M. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutLalpha. *Mol Cell Biol.* 2003;23:3320-8.
29. O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis.* 2006;27:682-92.

30. Yang G, Scherer SJ, Shell SS, Yang K, Kim M, Lipkin M, et al. Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell*. 2004;6:139-50.
31. Lin DP, Wang Y, Scherer SJ, Clark AB, Yang K, Avdievich E, et al. An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. *Cancer Res*. 2004;64:517-22.
32. Yoshioka K, Yoshioka Y, Hsieh P. ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell*. 2006;22:501-10.
33. Shimodaira H, Yoshioka-Yamashita A, Kolodner RD, Wang JY. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:2420-5.
34. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*. 2000;113:1661-70.
35. Melino G. p73, the "assistant" guardian of the genome? *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010:9-15.
36. Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci*. 2005;96:729-37.
37. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000;404:99-103.
38. Nicolaidis NC, Carter KC, Shell BK, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW. Genomic organization of the human PMS2 gene family. *Genomics*. 1995;30:195-206.

39. Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, et al. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell*. 1995;82:309-19.
40. Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem*. 2000;275:18424-31.
41. Yao X, Buermeyer AB, Narayanan L, Tran D, Baker SM, Prolla TA, et al. Different mutator phenotypes in Mlh1- versus Pms2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:6850-5.
42. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. 1999;399:806-9.
43. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995;9:48-55.
44. Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:1547-54.
45. Gibson SL, Narayanan L, Hegan DC, Buermeyer AB, Liskay RM, Glazer PM. Overexpression of the DNA mismatch repair factor, PMS2, confers hypermutability and DNA damage tolerance. *Cancer Lett*. 2006;244:195-202.
46. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:89-96.
47. Ricciardone MD, Ozcelik T, Cevher B, Ozdag H, Tuncer M, Gurgey A, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological



- malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res.* 1999;59:290-3.
48. Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Frappaz D, Bergeron C, Navarro C, et al. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res.* 1999;59:294-7.
49. Agostini M, Tibiletti MG, Lucci-Cordisco E, Chiaravalli A, Morreau H, Furlan D, et al. Two PMS2 mutations in a Turcot syndrome family with small bowel cancers. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1886-91.
50. Guarne A, Junop M-S, Yang W. Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. *EMBO J.* 2001;20:5521-31.
51. Ban C, Yang W. Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell.* 1998;95:541-52.
52. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:681-710.

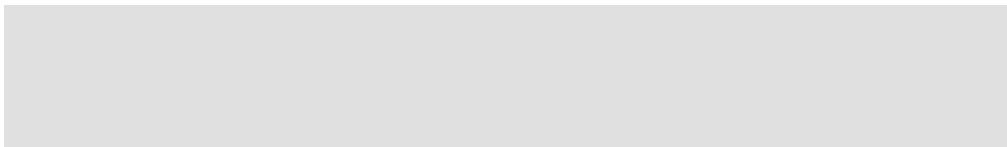
## 10. ŽIVOTOPIS

*Ivana Marinović Terzić, dr. med.*

MB: 276644

### CURRICULUM VITAE

#### OSOBNI PODACI



#### OBRAZOVANJE

##### *Srednjoškolsko:*

- 1988-1992. Zdravstveni obrazovni centar u Splitu – Laboratorijski tehničar  
Prosječna ocjena 5,0

##### *Dodiplomski studij:*

- 1992-1999. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu – Doktor Medicine (diplomirala 12.07.1999.). Prosječna ocjena: 4,2

##### *Poslijediplomski studij:*

- Poslijediplomski znanstveni studij – Temeljne i kliničke Medicinske znanosti, smjer Klinička Fiziologija. Prosječna ocjena 4,8
- 2004. (*Short term fellowship*) tromjesečna radna edukacija na Sveučilištu Goethe School of Medicine, Frankfurt – Institute of Biochemistry, grupa Prof. dr.sc. Ivan Đikić
- 2006–2007. rad i edukacije u polju Molekularne Biologije u grupi Prof. dr. sc Jean Y.J. Wang, UCSD, Kalifornija („postdoctoral fellow“ pozicija u trajanju od 1 godine)

#### ZAPOSLENJA

04.10. 1999. – 12.06.2000. *Klinička bolnica Split* – Pripravnički staž

13.06. 2000. do danas – Znanstveni novak – Asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu:

- 2000 – 2002. znanstveni novak na projektu: „Plućna embolija – model suhog ronjenja“, voditelj Prof. dr. sc. Željko Dujić
- 2003 – 2008. znanstveni novak na projektu: „Studije povezanosti i izražaja gena kod čovjeka“, voditelj Prof. dr. sc. Janoš Terzić
- 2008- do danas znanstveni novak na projektu: „Uoga upalnih procesa u nastanku malignih tumora“, voditelj Prof. dr. sc. Janoš Terzić

Od akademske godine 2007/08. sudjelujem u radu Povjerenstva za nastavu kao povjerenik druge godine studija.

Na dodiplomskom studiju Medicine sudjelujem u nastavi već šest godina na predmetima Biologija s genetikom i Imunologija na studijima Medicine i Stomatologije.

### **KONGRESI**

2001. međunarodni kongres sportske znanosti: 6<sup>th</sup> ECSS Congres, Keln, Njemačka

2002. međunarodni kongres sportske znanosti: 7<sup>th</sup> ECSS Congres, Atena, Grčka

2003. The Third International Conference on Signal Transduction, Cavtat, Croatia

2008. EMBO meeting on Cellular Signaling & Molecular Medicine, Dubrovnik, Croatia

### **PODRUČJE RADA**

Na početku istraživačkog rada proučavala sam utjecaj ronjenja na kardiovaskularnu funkciju kod ljudi, u grupi Prof. Dujića.

Sada proučavam različite aspekte molekularne medicine i genetike (Diabetes tip1, Alzheimerova bolest), kao i povezanost regulacije kortizola i autizma, u grupi Prof. Terzića.

Posljednje dvije godine moj znanstveni rad bio je usmjeren poglavito na proučavanju popravaka DNA oštećenja i posljedica mutacija u proteinu PMS2, u grupi Prof. Wang. Na tome se temelji i moja Doktorska disertacija.

Vladam velikim brojem istraživačkih tehnika molekularne biologije, koje sam naučila u vrhunskim istraživačkim laboratorijima. Tehnike koje rutinski koristim su:

- a) Tehnike analize DNA: izolacije DNA, PCR, elektroforeza, restrikcijska digestija, SSCP, ciljane mutacije gena, produkcija rekombinantne DNA (kloniranje), multiplikacija i izolacije plazmidne DNA, analiza sekvencirane DNA, kreiranje primera (začetnica).
- b) Tehnike analize RNA: izolacija RNA, produkcija cDNA, kvantitativni PCR (mjerjenje genske aktivnosti), gašenje genske aktivnosti metodom si-RNA.
- c) Tehnike analize proteina: izolacija proteina, elektroforeza, Western blotting, imunoprecipitacija, ELISA test, kreacija i produkcija rekombinantnih proteina (GST *fusion*), mjerjenje apoptoze TUNEL testom.
- d) Ostale tehnike: rad sa staničnim kulturama, transfekcija gena u stanicu, produkcija i manipulacija virusnim vektorima, protočna citometrija, te neke druge tehnike.

**e-mail adresa:** imart@bsb.mefst.hr

#### **Objavljeni radovi u časopisima indeksiranim u CC:**

1. **Marinovic-Terzic I**, Yoshioka-Yamashita A, Shimodaira H, Avdievich E, Hunton IC, Liskay MR, Kolodner RD, Edelmann W, Wang J.Y . Apoptotic Function of Human PMS2 Compromised by the Nonsynonymous Single Nucleotide Polymorphic Variant R20Q. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008 In press.
2. Terzic J, **Marinovic-Terzic I**, Ikeda F, Dikic I. Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):942-5.
3. Marinović-Ćurin J, **Marinović-Terzić I**, Bujas-Petković Z, Zekan L, Skrabić V, Dogaš Z, Terzić J. Slower cortisol response during ACTH stimulation test in autistic children. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2008 Feb;17(1):39-43.
4. Dujic Z, Ivancev V, Valic Z, Bakovic D, **Marinovic-Terzic I**, Eterovic D, Wisloff U. Postexercise hypotension in moderately trained athletes after maximal exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2006 Feb;38(2):318-22.
5. Dujic Z, Bakovic D, **Marinovic-Terzic I**, Eterovic D. Acute effects of a single open sea air dive and post-dive posture on cardiac output and pulmonary gas exchange in recreational divers. *Br J Sports Med*. 2005 May;39(5):e24.
6. Zemunik T, Skrabic V, Boraska V, Diklic D, **Marinovic-Terzic I**, Capkun V, Peruzovic M, Terzic J. FokI polymorphism, vitamin D receptor, and interleukin-1 receptor haplotypes are associated with type 1 diabetes in the Dalmatian population. *J Mol Diagn*. 2005 Nov;7(5):600-4.
7. Dujic Z, Duplancic D, **Marinovic-Terzic I**, Bakovic D, Ivancev V, Valic Z, Eterovic D, Petri NM, Wisloff U, Brubakk AO. Aerobic exercise before diving reduces venous gas bubble formation in humans. *J Physiol*. 2004 Mar 16;555 (Pt 3):637-42.

8. Cikes V, Abaza I, Krzelj V, **Marinovic-Terzic I**, Tafra R, Trlaja A, Marusic E, Terzic J. Prevalence of factor V Leiden and G6PD 1311 silent mutations in Dalmatian population. *Arch Med Res*. 2004 Nov-Dec;35(6):546-8
9. Bakovic D, Valic Z, Eterovic D, Vukovic I, Obad A, **Marinovic-Terzic I**, Dujic Z. Spleen volume and blood flow response to repeated breath-hold apneas. *J Appl Physiol*. 2003 Oct;95(4):1460-6.
10. Curin JM, Terzic J, Petkovic ZB, Zekan L, **Marinovic-Terzic I**, Susnjara IM. Lower cortisol and higher ACTH levels in individuals with autism. *J Autism Dev Disord*. 2003 Aug;33(4):443-8.

#### **Radovi na recenziji:**

1. Marinović-Ćurin J, **Marinović-Terzić I**, Bujas-Petković Z, Zekan Lj, Marin J, Terzić J. Lower plasma cortisol level in parents of autistic individuals. *Autism* (submitted).
2. **Marinović-Terzić I**, Marasović-Šušnjara I, Marin J, Mimica N, Folnegović-Šmalc V, Đogaš Z, Marinović-Ćurin J, Terzić J. Lack of association between Alzheimer disease and Histamine N-methyltransferase functional polymorphism Thr105Ile. *Neurol Sci* (submitted).

#### **Kongresni sažeci:**

1. **Marinovic Terzic I**, Marusic J, Bakovic D, Dujic Z. Lung volumes breathing patterns after a single air dive to 30 m: influence of posture. 6<sup>th</sup> ECSS Congres, Cologne; 2001: 938
2. Marusic J, **Marinovic Terzic I**, Bakovic D, Dujic Z. Pulmonary gas exchange after a single air dive to 30 m: influence of posture. 6<sup>th</sup> ECSS Congres, Cologne; 2001: 939
3. Bakovic D, **Marinovic Terzic I**, Marusic J, Dujic Z. Mild desaturation and reduction in pulmonary diffusing capacity (DLCO) after short maximal exercise in professional soccer players. 6<sup>th</sup> ECSS Congres, Cologne; 2001: 1259
4. **Marinovic Terzic I**, Bakovic D, Ivancev V, Dujic Z. Acute cardiorespiratory function change in recreational divers after open sea air dive. 7<sup>th</sup> ECSS Congres, Athens; 2002: P356, 259.
5. Bakovic D, Valic Z, **Marinovic Terzic I**, Dujic Z. Spleen and cardiopulmonary response to repetitive maximal apnea in humans. 7<sup>th</sup> ECSS Congres, Athens; 2002: P355, 258.
6. Valic Z, Ivancev V, **Marinovic Terzic I**, Bakovic D, Dujic Z. Cardiorespiratory changes in profesional soccer players after short maximal exercise. 7<sup>th</sup> ECSS Congres, Athens; 2002: P844, 764.
7. **Marinović Terzic I**, Marasovic Susnjara I, Marin J, Folnegovic Smalc V, Dogas Z and Terzic J. Lack of association between Alzheimer disease and Histamine N-methyltransferase functional polymorphism. 4<sup>th</sup> Croatian Congress of Pharmacology.