

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

JAN ČERNUŠEVIČ

**Trankripcijos faktoriaus p53 fluorescencinio reporterio sukūrimas,
modifikavimas ir pritaikymas**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovas
Dr. Mindaugas Valius

Vilnius 2023

TURINYS

SANTRUMPOS	6
SANTRAUKA	7
SUMMARY	9
ĮVADAS	11
P53 – genomo sargas	11
LITERATŪROS APŽVALGA	14
P53 genomo sargas	14
P53 atradimo istorija ir įtaka kancerogenezei.....	15
P53 struktūra ir funkcijos	16
1. MEDŽIAGOS IR METODAI	19
2.1. Aparatūra	19
2.2. Medžiagos.....	19
2.2.1. <i>E. coli</i> bakterijų kamienai	19
2.2.2. Žmogaus ląstelių linijos	19
2.2.3. Reagentai bakterijų auginimui, kompetentinių bakterijų paruošimui bei teigiamų transformantų atrankai	19
2.2.4. Reagentai žmogaus ląstelių kultivavimui	20
2.2.5. Priešvėžiniai vaistai	20
2.2.6. MDM2 aktyvumo inhibitoriai.....	20
2.2.7. Reagentai žmogaus ląstelių transfekcijai ir stabilių ląstelių linijų kūrimui	20
2.2.8. Rinkiniai DNR išskyrimui ir gryninimui.....	20
2.2.9. Rinkiniai PGR.....	20
2.2.10. Rinkiniai kolonijų PGR.....	20
2.2.11. Rinkiniai genų klonavimui.....	20
2.2.12. Kiti fermentai darbams su DNR	20
2.2.13. Kiti reagentai ir rinkiniai darbams su DNR	21
2.2.14. Reagentai DNR elektroforezei	21
2.2.15. Plazmidės	21

2.2.16. C57BL/6J pelių kDNR.....	21
2.2.17. PC1, PC2 vėžinių ląstelių linijų kDNR.....	22
2.2.18. Pradmenys ir kiti oligonukleotidai.....	22
2.3. Metodai	22
2.3.1. <i>E. coli</i> chemokompetentinių ląstelių paruošimas naudojant magnio chloridą, DMSO ir PEG.....	22
2.3.2. Chemokompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių transformacija ir kolonijų auginimas.....	23
2.3.3. Transformuotų <i>E. coli</i> bakterijų kultūrų auginimas ir plazmidinės DNR gryninimas.....	23
2.3.4. DNR fragmentų gryninimas iš agarozinio gelio, restrikcijų bei PGR mišinių	24
2.3.5. Analitinės plazmidinės DNR restrikcijos endonukleazėmis.....	24
2.3.6. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje su etidžio bromido dažymu	24
2.3.7. Pradmenų ir kitų nukleotidų dizaininimas, PGR ir klonavimas in silico, plazmidžių sekų talpinimas ir sekoskaitos rezultatų vizualizavimas	25
2.3.8. Sekoskaita	25
2.3.9. Oligonukleotidų sintezė	25
2.3.10. Oligonukleotidų sulydymas	25
2.3.11. DNR koncentracijos matavimas	25
2.3.12. Kolonijų PGR.....	26
2.3.13. pCW57 (Puro) konstravimas.....	26
2.3.14. pEGFP-C2-PEST konstravimas.....	27
2.3. 15. pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP konstravimas	27
2.3.16. pJET-P21p konstravimas	27
2.3.17. pLJM1-deGFP (pLJM1-eGFP-PEST) konstravimas	28
2.3.18. pLJM1-P21p-eGFP ir pLJM1-P21p-deGFP konstravimas.....	28
2.3.19. pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP konstravimas	28
2.3.20. pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA,	29
pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod,	29
bei plazmidžių deGFP versijų konstravimas.....	29
2.3.21. Modifikuoto P53 reporterio versijų galutinių konstrukčių sukūrimas.....	29

2.3.22. pJET-P53 konstravimas P53 sekoskaitai	30
2.3.23. Žmogaus ląstelių kultivavimo sąlygos ir persėjimas	30
2.3.24. Žmogaus HEK293T ląstelių linijos transfekcija lentivirusinių vektorių gamybai	31
2.3.25. Ląstelių linijų lentivirusinė transdukcija.....	31
2.3.26. Transdukuotų ląstelių atranka su puromicinu	31
2.3.27. Žmogaus ląstelių eGFP signalo vertinimas naudojant tėkmės citometriją	32
2.3.28. Tėkmės citometrijos duomenų statistinė analizė	33
2. REZULTATAI	34
3.1. pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP konstravimas ir PEST sekos veiklumo įvertinimas	34
3.1.1. pCW57 (Puro) konstravimas.....	34
3.1.2 pEGFP-C2-PEST konstravimas	35
3.1.3. pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP konstravimas	37
3.1.4. Indukuotų eGFP ir deGFP fluorescencijos intensyvumų palyginimai	39
3.2. pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP reporterių konstravimas ir validavimas	40
3.2.1. pJET-P21p konstravimas	40
3.2.2. pLJM1-deGFP konstravimas	42
3.2.3. pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP konstravimas	43
3.2.4. P21p-eGFP bei P21p-deGFP P53 reporterių validavimas	45
3.3 Fluorescencinio P53 reporterio pritaikymas.....	50
3.3.1. HepG2 ląstelių linijos P53 transkripcinio aktyvumo nustatymas	50
3.3.2. PC1 ir PC2 ląstelių linijų <i>TP53</i> genotipavimas bei transkripcinio aktyvumo nustatymas	53
3.4. P53 fluorescencinio reporterio modifikavimas.....	57
3.4.1. pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP konstravimas	59
3.4.2. pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA, pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod bei deGFP versijų plazmidžių konstravimas.....	60
3.4.3. Modifikuoto P53 reporterio versijų galutinių konstrukčių sukūrimas ir jų validavimas....	61
REZULTATŲ APTARIMAS	68

IŠVADOS	73
ASMENINIO INDĒLIO APRAŠYMAS	74
PADĒKA	75
LITERATŪROS SARAŠAS	76

SANTRUMPOS

5-FU – 5-fluoruracilas

Ap – ampicilinas

CDKN1A - Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A

CMV – citomegalo virusas

deGFP – destabilizuotas eGFP

DMEM – Dulbecco's modifikuota Eagle's terpė

DMSO – dimetilsulfoksidai

Dox – doksiciklinas

FBS – fetalinis veršelio serumas

hPGK - human phosphoglycerate kinase

IMDM - Iscove's Modified Dulbecco's terpė

LB – Luria-Bertani mitybinė terpė

MCS – daugybinis klonavimo regionas (angl. *multiple cloning site*)

minCMVmod – minimalus CMV modifikuotas

NF – Nuclease Free

ODC1 - Ornithine Decarboxylase 1

OxaPT - oksaliplatina

P21p/P21prom/P21Prom – P21 promotorius

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas

pDNR – plazmidinė DNR

PEG – polietilenglikolis

PEST – prolinas, glutamatas, serinas, treoninas

PNK – polinukleotidų kinazė

PuroR – puromycin resistance

RE – responsive element

RtTA – atvirkštinio tetraciklino transaktyvatoriaus baltymas

TBE – Tris-boratas-EDTA

TSS - Transformation and Storage Solution

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Jan Černuševič

**Transkripcijos faktoriaus p53 fluorescencinio reporterio sukūrimas, modifikavimas ir
pritaikymas**

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

P53 – labai svarbus vėžio prevencijai transkripcijos faktorius, todėl yra itin svarbu gebėti įvertinti jo transkripcinį aktyvumą gyvoje ląstelėje realiu laiku. Tą galima padaryti sukūrus jo fluorescencinį reporterį. Padidinti tokio reporterio jautrumą transkripcinio aktyvumo pokyčiams būtų galima destabilizavus fluorescencinį baltymą.

Lentivirusinio „TET ON“ vektoriaus higromicino atsparumo genas buvo pakeistas į puromicino atsparumo geną. Pelių *ODC1* geno PEST seka buvo klonuota į pEGFP-C2 vektorių. Buvo atlikta pEGFP-C2-PEST konstrukto sekoskaita. Tuomet įprastas bei destabilizuotas eGFP variantai buvo subklonuoti į „TET ON“ sistemos vektorių. Buvo išvestos atitinkamos ląstelių linijos, jose buvo indukuota eGFP bei deGFP raiškos. Palyginimas parodė dramatišką skirtumą tarp eGFP bei deGFP fluorescencijos intensyvumų. Buvo padaryta išvada, jog PEST seka yra veikli. Tuomet P21 promotoriaus seka su dviem P53 atpažinimo elementais buvo klonuota į pJET plazmidę. Buvo atlikta konstrukto sekoskaita. Tada P21 promotorius buvo subklonuotas į lentivirusines plazmides priešais eGFP ir deGFP genų sekas. Gautų konstrukto transdukcijai ir validavimui buvo pasirinktos HCT116 bei HCT116-p53^{-/-} ląstelių linijos. Tuomet išvestos linijos buvo paveiktos fiksuotomis P53 induktorių – nutlino ir oksaliplatinos koncentracijomis. Buvo nustatyta, jog reporteriai reaguoja į P53 egzistavimą ir jo transkripcinio aktyvumo indukciją. Buvo atliktas nutlino ir oksaliplatinos dozių titravimas. Regresinė analizė parodė, jog sistemos variantas su įprasta eGFP versija yra geresnis naudojimui su tėkmės citometru. Naudojant eGFP reporterio versiją, buvo patvirtintas HepG2 ląstelių linijos teigiamas P53 statusas. Buvo atlikta PC1 ir PC2 ląstelių linijų *TP53* geno koduojančio regiono sekoskaita. Buvo nustatyta nauja *TP53* mutacija c.1025delG (p.Arg342Glnfs*3). Naudojant sukurtą reporterį buvo parodyta, jog P53 su šita mutacija neturi transkripcinio aktyvumo. Buvo pabandyta padidinti P53 reporterio specifiškumą, pakeitus P21 promotorių į viengubą bei trigubą P53 atsako elementų bei YB_TATA ir minCMVmod minimalių promotorių skirtingus derinius. Deriniai su minimaliu YB_TATA promotoriumi buvo neveiklūs. Deriniai su minCMVmod promotoriumi buvo tik dalinai veiklūs, tačiau daugiau specifiniai.

Galų gale, galima teigti, jog P53 fluorescencinis reporteris buvo sukurtas, sėkmingai pritaikytas HepG2, PC1 ir PC2 ląstelių linijų P53 variantų transkripcinio aktyvumo nustatymui. Tačiau, jo modifikavimas nepavyko.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Jan Cernusevic

Development and Applications of a Transcription Factor P53 Responsive Fluorescent Reporter

Master thesis

SUMMARY

P53 is an extremely important for cancer suppression transcription factor. Thus, it would be beneficial to assess its transcriptional activity in living cells in real time. This can be achieved by creating its fluorescent reporter. The sensitivity of such a reporter to changes in transcriptional activity could be enhanced by destabilizing the fluorescent protein.

The hygromycin resistance gene of the lentiviral "TET ON" system vector was replaced with the puromycin resistance gene. The PEST sequence of the mouse *ODC1* gene was cloned into the pEGFP-C2 vector. The pEGFP-C2-PEST construct was sequenced. Then, both standard and destabilized eGFP variants were subcloned into the "TET ON" system vector. Corresponding cell lines were derived, and eGFP and deGFP expressions were induced in them. The comparison showed a dramatic difference between the intensities of eGFP and deGFP fluorescence. It was concluded that the PEST sequence is active. Then, the P21 promoter sequence with two P53 responsive elements was cloned into the pJET plasmid. The construct was sequenced. Then, the P21 promoter was subcloned into lentiviral plasmids before the sequences of eGFP and deGFP genes. For the transduction and validation of the obtained constructs, HCT116 and HCT116-p53^{-/-} cell lines were selected. The derived lines were then exposed to fixed concentrations of P53 inducers - nutlin and oxaliplatin. It was found that the reporters respond to the existence of P53 and the induction of its transcriptional activity. Nutlin and oxaliplatin dose titrations were performed. Regression analysis showed that the system variant with the standard eGFP version is better for use with flow cytometry. Using the eGFP reporter version, the positive P53 status of the HepG2 cell line was confirmed. The sequencing of the coding region of the *TP53* gene of PC1 and PC2 cell lines was performed. A new *TP53* mutation c.1025delG (p.Arg342Glnfs*3) was identified. Using the created reporter, it was shown that P53 with this mutation has no transcriptional activity. Attempts were made to increase the specificity of the P53 reporter by replacing the P21 promoter with single and triple P53 response elements and different combinations of YB_TATA and minCMVmod minimal promoters.

Combinations with the minimal YB_TATA promoter were inactive. Combinations with the minCMVmod promoter were only partially active, but specificity was increased.

In conclusion, it can be stated that the P53 fluorescent reporter was created and successfully applied to determine HepG2, PC1, and PC2 cell lines' P53 transcriptional activity. However, its modification was unsuccessful.

IVADAS

P53 – genomo sargas

P53 – labiausiai ištirtas transkripcijos faktorius. Labai sudėtinga rasti ląstelinį procesą, kurio jis neveiktų. Tikriausiai, pati žinomiausia jo funkcija yra naviko formavimosi slopinimo. Tačiau, po atradimo iš pradžių P53 buvo žinomas kaip onkogenas. Tokia interpretacija buvo susijusi su tuo, jog šio baltymo mutantai dažnai įgauna papildomų funkcijų, kurios stimuliuoja kancerogenezę ir atsparumą priešvėžiniams preparatams. Tik po 10 metų P53 buvo priskirtas prie navikų supresorių. 50% navikų jis turi išaktyvuojančias mutacijas. Šis transkripcijos faktorius realizuoja savo priešvėžinę funkciją per ląstelinio ciklo stabdymo, DNR pažaidų taisymo, ląstelinio senėjimo ir ląstelinės žūties indukcijas. Be to, P53 statusas apsprendžia vėžiu sergančių ligonių atsaką į daugumą priešvėžinių preparatų. Nepaisant aukščiau išvardintų funkcijų, šis transkripcijos faktorius dalyvauja ir kituose svarbiuose procesuose, tokiuose kaip epitelio-mezenchiminis virsmas ir embriogenezė.

Nepaisant to fakto, jog P53 labiausiai ištirtas transkripcijos faktorius, iki pilno jo veikimo supratimo dar labai toli. Kadangi P53 realizuoja pagrindines savo funkcijas kaip transkripcijos faktorius, vienas iš jo tyrimo būdų yra jo transkripcinio aktyvumo tiesioginis arba netiesioginis stebėjimai. Netiesioginis jo transkripcinio aktyvumo įvertinimas dažniausiai realizuojamas per metodus, susijusius su jo kiekiu ląstelėse. Tai kiekybinis PGR, imunohistochemija, imunocitochemija ir imunoblotas. Tačiau, nors P53 kiekis ląstelėse koreliuoja su jo transkripciniu aktyvumu, tai yra tik koreliacija, bet ne priežastinis ryšys. Be to, dauguma metodų leidžia įvertinti jo kiekį tik jau sulizuotų ląstelių visumoje arba audiniuose ir pavienėse fiksuotose ląstelėse. Tačiau, neseniai buvo išaiškinta, jog P53 baltymo kiekis bei transkripcinis aktyvumas periodiškai keičiasi ląstelėse ir po poveikių citotoksinais preparatais irgi pastebimos osciliacijos. Galutinę jų reikšmę dar reikės išaiškinti. Tačiau, jau dabar žinoma, kad jos yra svarbios.

Taigi, tam, kad būtų galima tiesiogiai stebėti P53 transkripcinį aktyvumą gyvoje ląstelėse įmanomi du variantai. Pirmas variantas yra genetiškai modifikuoti jo taikininio geno seką *in vivo* taip, jog kartu būtų fluorescencinio baltymo raiška. Tai jau buvo padaryta su P53 pagrindinio taikinio, *CDKN1A* geno seka (koduoja P21 baltymą). Tačiau, tokia prieiga turi net tris problemas:

- a) Realizavimo problema. Naujos CRISPR/Cas9 sistemos variacijos vis dar sudėtingai įveda ilgas sekas į genomą;
- b) Specifiškumo problema. Akivaizdu, jog P53 taikininio genų promotoriai turi ne tik P53 atsako elementus;

- c) Taikininio geno baltymo išveiklinimo problema. Net jei nenaudojamas baltymų suliejimo metodas, prieš arba po taikininio geno įvedant 2A peptidus, vis tiek lieka išveiklinimo rizika.

Kito varianto principas yra senesnis, bet patikimesnis: taikininio transkripcijos faktoriaus taikininio geno promotorius su atitinkamo faktoriaus atpažinimo elementais klonuojami į plazmidę priešais fluorescencinio baltymo geną. Tokiu būdu iš karto išsprendžiamos a ir c problemos. Tačiau, lieka specifiškumo problema. Ją būtų galima išspręsti vietoj taikininio geno promotoriaus klonuojant tik taikininio transkripcijos faktoriaus atsako elementus bei minimalų (šerdinį) promotorių.

Norint stebėti transkripcijos faktorių transkripcinio aktyvumo pokyčius nelabai tinka įprastų fluorescencinių baltymų sekos, nes jų pusėjimo laikai ląstelėse dažniausiai labai ilgi ir matuojami dienomis. Tačiau, baltymų pusėjimo laikus galima sumažinti, pavyzdžiui, pridėdant sekas, kuriose daug prolinų, glutamatų, serinų ir treoninų aminorūgščių liekanų (PEST sekos). Tokios sekos nukreipia turinčius jas baltymus proteosominiam degradavimui, žymiai sumažinant jų pusėjimo laiką. Tokių modifikuotų fluorescencinių baltymų sekos vadinamos destabilizuotomis.

Transkripcijos faktorių fluorescencinių reporterių potencialus pritaikymas yra labai platus. Pavyzdžiui, galima tikrinti nežinomo statuso pagal tuos faktorius ląstelių linijas. Taip pat, nustatinėti naujai atrastų mutacijų poveikį faktoriaus transkripciniam aktyvumui.

Tikslas

Sukurti P53 transkripcijos faktoriaus fluorescuojančius reporterius ir ištirti jų veiklumą bei specifiškumą įvairiose vėžinėse ląstelėse.

Uždaviniai

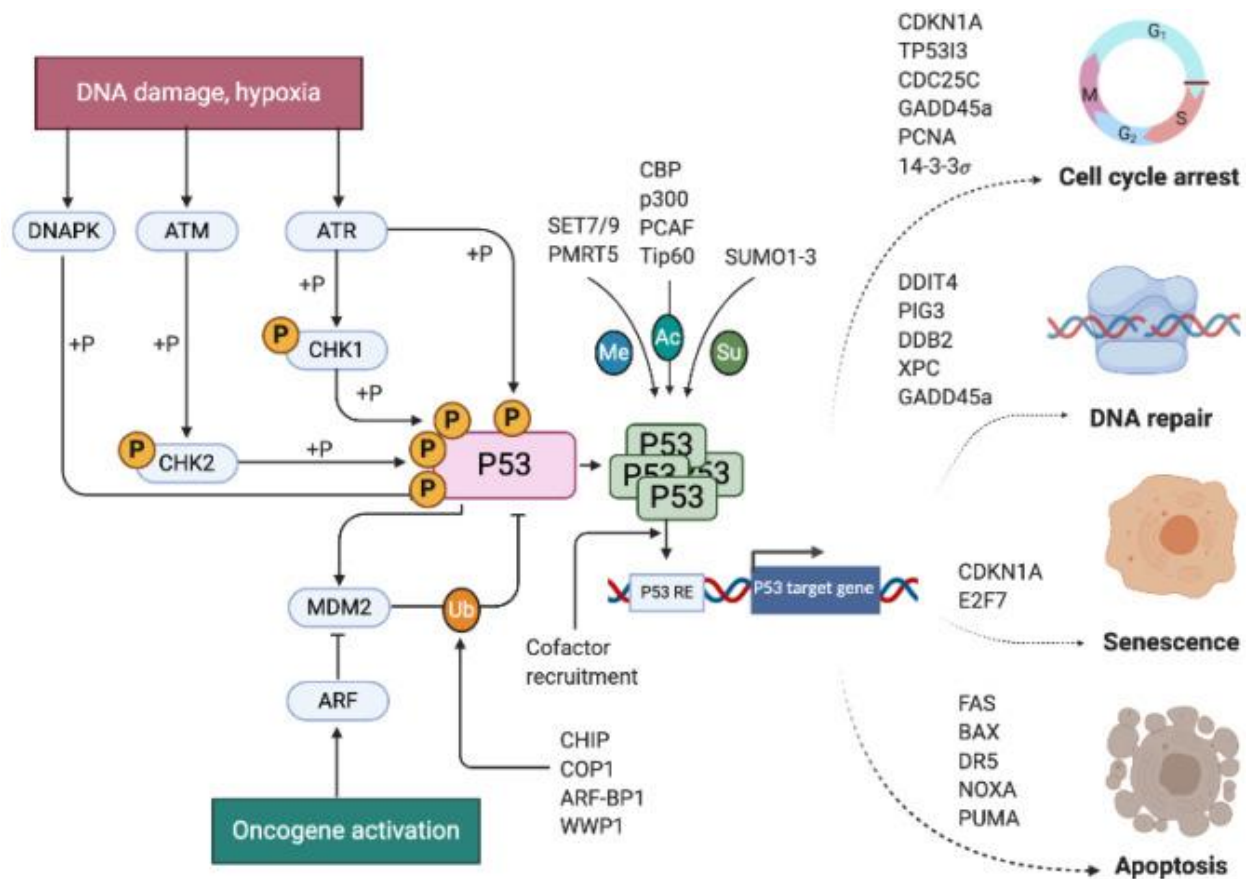
1. Pakeisti higromicino atsparumo geną į puromicino atsparumo geną „TET ON“ sistemos vektoriuje;
2. Klonuoti PEST seką iš pelių *ODC1* geno į pEGFP-C2 vektorių, po to subklonuoti eGFP bei deGFP genų sekas į vektorių su „TET ON“ sistema, išvesti atitinkamas ląstelių linijas, indukuoti tų genų raišką bei sulyginti fluorescencijos intensyvumus;
3. Klonuoti P21 promotoriaus seką į pJET plazmidę, atlikti jos sekoskaitą, subklonuoti į lentivirusinį vektorių prieš eGFP bei deGFP genus, išvesti atitinkamas ląstelių linijas, nustatyti gautų sistemų veiklumą ir specifiškumą P53;
4. Įvertinti HepG2 ląstelių linijos P53 statusą, patikrinus jo transkripcinį aktyvumą taikant naujai gautą reporterį;
5. Atlikti PC1 ir PC2 ląstelių linijų *TP53* koduojančio regiono sekoskaitą ir įvertinti šitų linijų P53 variantų transkripcinį aktyvumą;

6. Padidinti P53 transkripcinio reporterio specifiškumą, klonuojant skirtingus atsako elementų bei minimalius promotorių variantus vietoj P21 promotoriaus į reporterines plazmides.

LITERATŪROS APŽVALGA

P53 genomo sargas

TP53 yra genas, kuris koduoja P53 naviko supresorinį baltymą, dažnai vadinamą „Genomo sargu“ (Lane, 1992). Jo pagrindinė biologinė funkcija yra genomo integralumo palaikymas. Be to, P53 atlieka papildomas funkcijas vystymesi, ląsteliniame senėjime ir ląstelių diferenciacijoje (Jain & Barton, 2018). Pavyzdžiui, P53^{-/-} genetinių modelių fenotipai pasižymi išankstiniu senėjimu, ląstelių pluripotencijos indukavimu ir embrionų negalėjimu atlikti gastruliaciją (Hong et al, 2009; Tyner et al., 2002). P53 baltymas yra transkripcijos faktorius, kuris valdo daugelio biologinių procesų rezultatą priklausomai nuo ląstelinio streso tipo. Streso signalai, aktyvuojantys p53, įjungia onkogenų aktyvaciją, DNR pažeidimą ir replikacinį stresą (Kasthuber & Lowe, 2017). Reaguodamas į šiuos stresus, P53 yra modifikuojamas post-transliaciniame etape ir, priklausomai nuo ląstelinio streso tipo indukuoja atitinkamų genų transkripciją, taip valdydamas ląstelės likimą (Bode & Dong, 2004). Daugiausiai ištirti biologiniai procesai, kuriuose dalyvauja P53, yra ląstelinio ciklo stabdymas, senėjimas, DNR reparacija ir apoptozė (1 pav.). Per pastaruosius metus mokslininkai nustatė daug kitų biologinių procesų, kuriems P53 yra svarbus. Tai autofagija, ląstelinis metabolizmas, ferroptozė ir procesai, susiję su reaktyvių deguonies rūšių susidarymu. Kai kuriuos iš šių biologinių procesų P53 neveikia kaip transkripcijos faktorius, bet realizuoja savo aktyvumą per sąveiką su kitais baltymais. Pavyzdžiui, apoptozės signalinio kelio aktyvacija gali atsitikti dėl P53 sąveikos su antiapoptiniais baltymais mitochondrijose.



1 pav. P53 signalinių kelių apžvalga. Ląsteliniai stresai, įskaitant DNR pažeidimus, onkogenų aktyvaciją, hipoksiją ir replikacinį arba transliacinį stresus, aktyvuoja jutiklinius baltymus ATM, ATR, Chk1, Chk2, DNA-PK ir p14ARF. Šitos kinazės fosforilina P53 taip jį stabilizuojant. Stabilizuotas P53 tetramerizuojasi ir sąveikauja su P53 atsako elementais genome. P53 stabilizavimo pagrindinis reguliatorius yra MDM2, kuris taip pat yra P53 taikiny, tuomet formuojamas neigiamas grįžtamasis ryšys. Kiti baltyminiai modifikatoriai ir kofaktoriai, kurie sąveikauja su P53 baltymu, reguliuoja jo taikinių genų transkripcinį aktyvumą (Hernández Borrero & EI-Deiry, 2021).

P53 atradimo istorija ir įtaka kancerogenezei

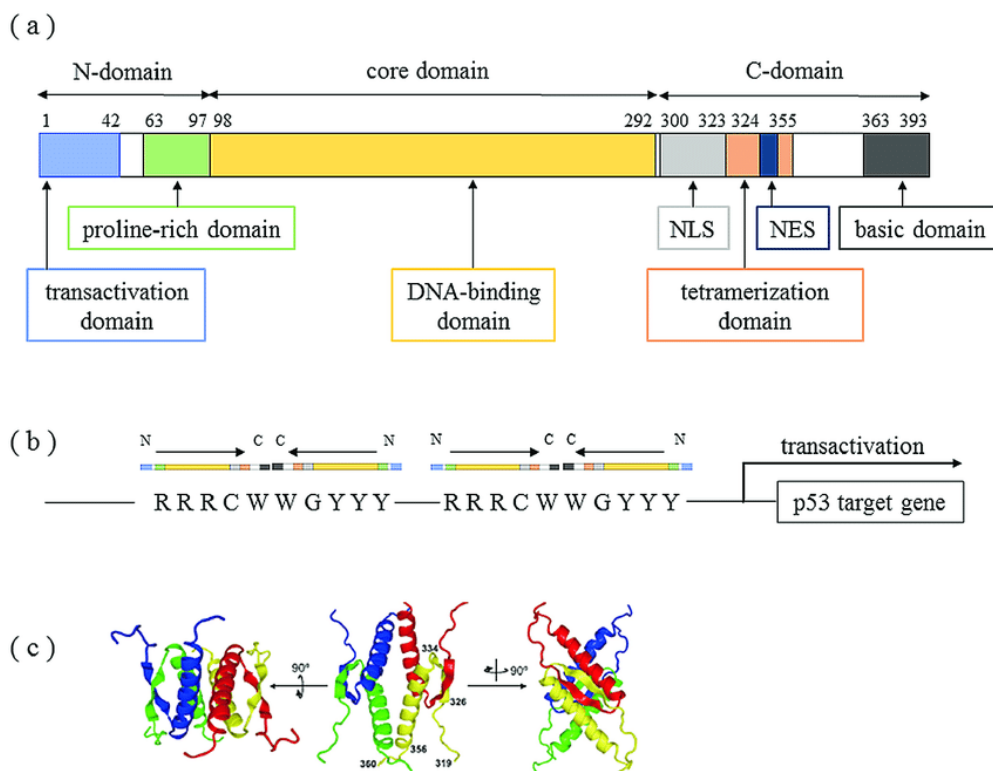
P53 yra mutuoatas net 50% žmogaus vėžio atvejų, o likusiuose 50% atvejų inaktyvuojamas jo signalinis kelias. Tai gali atsitikti dėl MDM2 amplifikacijos, p14ARF praradimo ir mutacijų ATM ir Chk2 aktyvuojančiose kinazėse (Lain & Lain 2003). P53 kelio funkcijos praradimas suteikia vėžinėms ląstelėms pranašumą apeiti onkogeninius ir DNR pažeidimų signalus, siekiant tęsti nenormalią proliferaciją. Nenuostabu, kad 1979 metais, kai P53 buvo pirmą kartą atrastas, buvo manyta, jog tai yra onkogenas, nes jo mutuoata forma buvo aptikta vėžinių audinių daugumoje dideliais kiekiais. Atitinkamai, P53 atradimas buvo susijęs su dideliu beždžionių viruso T-antigenu 40 (SV40), kurio įvedimas į ląsteles lėmė ląstelių transformaciją ir supiktybėjimą (Linzer & Levine, 1979). Ankstyvi tyrimai parodė, kad turimų P53 kDNR klonų transfekcija lėmė P53 ir Ras protoonkogeno kooperaciją, transformuojant žiurkės pirminius embrioninius fibroblastus (Luis et al., 1984). Tik 1989 metais buvo nustatyta, jog P53 yra navikų supresorius. Baker ir kt. (1989) siekė

ištirti 17p chromosomos regionus, dažnai prarandamus kolorektalinio vėžio atvejais, vieta kur yra *TP53* genas. Mokslininkų grupė klonavo ir sekvenavo likusius 17p chromosomos karcinomos navikų regionus ir palygino juos su anksčiau publikuotomis p53 sekomis. Išnagrinėjus sekvenavimo rezultatus, Baker ir kt. (1989) išaiškino, kad vienas navikas turi 143 kodono *missense* mutaciją (T > C pokytis), o kitas navikas turi 175 kodono G > C *missense* mutaciją (Baker et al., 1989). Be to, buvo nustatyta, jog tu pačių pacientų normalūs audiniai neturi šių mutacijų. Tai reiškia, jog šios mutacijos yra somatinės (Baker et al., 1989). Vėlgi, somatinės mutacijos regione, kuris koduoja P53 metė iššūkį onkogeno sampratai, tuomet buvo pripažinta, jog P53 geriau tinka navikų supresoriaus vaidmuo.

Pirmos P53^{-/-} C57BL/6 pelės buvo sukurtos 1992 metais naudojant mikroinjekcijos metodą. Šios pelės netikėtai neturėjo vystymosi defektų, tačiau, jos turėjo pastebimai didesnę vėžio atsiradimų riziką: vėžys pradėjo vystytis net 10 savaičių amžiuje, įskaitant sarkomas ir limfomas (Donehower et al., 1992). Šitas ir daugelis kitų vėlesnių tyrimų [20] pakeitė įsitvirtinusių P53 paradigmą, ir tada, pagaliau, P53 galutinai tapo naviko supresorius.

P53 struktūra ir funkcijos

Pirminė P53 baltymo struktūra susideda iš penkių pagrindinių domenų: transaktyvacijos domeno, prolinu turtingą domeno, DNR sąveikos domeno, tetramerizacijos domeno ir reguliavimo domeno (Harris, 1996) (2 pav.). Transaktyvacijos domenas (TAD) yra N-gale ir suskaidytas į dvi sritis: TAD1 ir TAD2. Šitos sritys leidžia p53 baltymui sąveikauti su įvairiais kofaktoriais, ir abu yra būtini nuo p53 priklausomam vėžio supresavimui, atsakant, pavyzdžiui, į DNR pažeidimų stresą (Brady et al, 2011). Vis dėlto, kiekvienas transaktyvacijos domenas suteikia p53 specifiskumą kofaktoriams, kuris savo ruožtu veikia ląstelės galutinį atsaką į tam tikrą stresą. TAD sritys taip pat būtinos sąveikai su MDM2 – P53 neigiamu reguliatoriumi (Lin et al., 1994). Esant stipriam DNR pažeidimui ir *Ras* onkogeno aktyvacijai, ląstelės su P53 su panaikintu TAD1 elgiasi kaip P53^{-/-}, tačiau kai kurie genai-taikiniai visgi ekspresuojami. Kita vertus, TAD2 panaikinimas nelabai veikia P53 funkcijų. Toks P53 gali indukuoti taikinių genų p21, Bax, Noxa ir Puma ekspresiją, taip pat geba sustabdyti ciklą ir indukuoti apoptozę. Abiejų domenų panaikinimas lemia P53^{-/-} fenotipo atsiradimą, įskaitant negalėjimą indukuoti ląstelinį senėjimą ir polinkį vėžio formavimuisi *in vivo* (Brady et al., 2011).



2 pav. (a) p53 domenų struktūra. Žmogaus p53 sudaro 393 aminorūgščių likučiai ir turi transaktyvacijos domeną, prolinu turtingą domeną, DNR-rišimo domeną, branduolio lokalizacijos signalo sritį, tetramerizacijos domeną, branduolio eksporto signalo sritį ir bazinį domeną. Modifikuota pagal. (b) Taikinių genų transkripcinio aktyvinimo mechanizmai p53 baltymu. Įvairūs stresai aktyvuoja p53, kuris tada atpažįsta seką RRRCWWGYYY (R: purino bazė, Y: pirimidino bazė, W: adeninas arba timinas) branduolyje ir sujungia su seka, sudarant tetramerą. (c) NMR (branduolinio magnetinio rezonanso) struktūra tetramerizacijos domenų. Tetramerizacijos domenai turi [β-strand-turn-α helix] struktūrą ir sudaro tetramerą iš 2 antiparalelinių β lakštų ir 4 helikso paketų (Tanaka et al., 2018).

Šalia TAD P53 baltymo struktūroje egzistuoja prolinu turtingas domenai (PRD), taip pat vadinama poliprolino (PP) regionu su pasikartojančiomis PXXP sekomis, kur P reiškia proliną, o X yra bet kokia aminorūgštis. Kaip ir TAD, PRD nėra būtinas P53 sąveikai su DNR. Nors yra įrodymų, kad PRD yra būtinas efektyviam vėžinių ląstelių kolonijų formavimosi slopinimui *in vitro*, kiti duomenys rodo, kad PRD panaikinimas netrukdo priklausomam nuo p53 transformuotų ląstelių kolonijų formavimosi slopinimui bei ciklo stabdymui, tačiau ląstelėse yra efektyviau indukuojama apoptozė (Walker & Levine, 1996; Sakamura et al., 1997; Baptistè et al., 2002). Transkripcinio reguliavimo lygmenyje tyrimai identifikavo šį regioną kaip svarbią dalį p53 taikinių genų, įskaitant GAS1 raiškiai (Ruaro et al., 1997). Šis regionas yra svarbus laukinio tipo p53 stabilumui, nes PRD panaikinimas sukelia p53 branduolinį eksportą ir p53 tampa linkęs ubiquitilinimui ir MDM2 tarpininkaujama degradacijai. Ypač esant MDM2, PRD domeno panaikinimas sumažina p53 transkripcinį aktyvumą, o tai rodo, kad panaikinimas/mutacijos šiame

regione turi neigiamų pasėkmių laukinio tipo p53 funkcijai (Berger et al., 2002). PRD vaidmuo taip pat buvo parodytas *in vivo*, kai jo panaikinimas sumažino timocitų gebėjimą atlikti apoptozę po apšvitinimo (Lowe et al., 1993). Įdomu, kad PRD turi skirtingus padarinius tarp sąveikos su MDM2 ir MDM4, su MDM2 susijusiu baltymu ir p53 neigiamu regulatoriumi. Pakenkta PRD lėmė didesnių navikų susidarymą nei laukinio tipo p53 pelėms, esant MDM2 ir MDM4. Vis dėlto, MDM4 ir p53 PRD sinchroninis panaikinimas, atkūrė pelių navikų svorį, panašų į WT p53 pelių, bet ne pelių su MDM2^{+/-}. Tai rodo, kad PRD neturintys p53 yra labiau jautresni MDM4 panaikinimui, o MDM4, o ne MDM2, daro p53 transkripciniu požiūriu neaktyvų (Toledo et al., 2006).

P53 centrinio branduolio regiono aminorūgščių liekanos nuo 102 iki 292 apima p53 DNR sąveikos domeną (DBD). Ši sritis leidžia p53 atlikti savo funkciją kaip transkripcijos faktorius sekos specifinėje tvarkoje, atpažįstant p53 atsako elementą (RE). Šią specifinę DNR seką, prie kurios prisijungia p53, sudaro dvi 10 bp sekos kopijas, atskirtas 0–13 bp, 5'-RRRCWWGYYY-3', kur R yra purinas, C yra citozinas, W gali būti adeninas ar timinas, G yra guaninas, o Y yra pirimidinas (El-Dayri et al., 1992). Kad genas būtų transkripciniu požiūriu reguliuojamas p53, jame turi būti dvi 10-bp p53 RE kopijos, o tai gali būti geno promotoriuje, introne arba geno apačioje.

p53 baltymo C-gale yra dar du svarbūs regionai: tetramerizacijos domenas ir C-galinio reguliavimo domenas. Tetramerizacijos domenas (TD) leidžia keturiems p53 baltymams oligomerizuotis kaip tetrameras, leidžiantis tinkamą baltymų konformaciją susijungti su DNR sekos atpažinimui (Halazonetis & Kandil, 1993). Sekų panaikinimai šiame regione ne tik veikia p53 galimybę susijungti su DNR, bet ir trukdo jo sąveikai su kitais baltymais (Gabizon et al., 2017). Parodyta, kad TD taip pat yra būtinas p53 post-transliacinėms modifikacijoms, tokioms kaip fosforilinimas ir ubikvitinacija. Svarbu, kad MDM2 ubikvitinacija grąžintų p53 į pradinį lygį, kai stresas yra baigtas, ir tam reikia, kad p53 būtų jo oligomerizuotoje būsenoje (Maki, 1999).

C-galinio domeno vaidmuo buvo laikomas reguliavimo domenu. Anksti per jo atradimą buvo manoma, kad jis neigiamai reguliuoja p53 ir jo nereikia DNR rišimuisi (Anderson et al., 1997). Dabar suprantama, kad šio regiono delecija neigiamai veikia p53 DNR rišimo domeną, kol C-galinis reguliavimo domenas yra pakitęs post-transliacinio modifikavimo po streso signalų. Tai lemia C-galinio reguliavimo slopinimo pašalinimą, leidžiantį p53 prisijungti prie RE.

Taigi, p53 baltymo struktūra apima sritis, kurios yra būtinos genų transkripcijai ir reguliavimui, ir yra atsakingos už streso atsaką.

1. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Aparatūra

Įvairaus tūrio mėgintuvėliai, glaistikliai, laminarinė spinta (ESCO), automatinės pipetės (Eppendorf), termoblokai (Biosan), minkšta purtyklė (Ika), purtyklės auginimui (Forma), spektrofotometras (Eppendorf), šaldoma stalinė centrifuga (Eppendorf), Petri lėkštelės (Sarstedt), DNR elektroforezės aparatas – elektros srovės šaltinis (E – C apparatus corporation), vonelės (Hofer), mini centrifuga – purtyklė (Biosan), analitinės svarstyklės (Kern), pH-metras (Knick), magnetinė maišyklė (Hanna), vartyklė (Stovall), termocikleris (Eppendorf), inkubatorius žinduolių ląstelių kultivavimui, tėkmės citometras (Guava easyCyte 8HT)(Merck).

2.2. Medžiagos

2.2.1. *E. coli* bakterijų kamienai

DH5 α – naudojamas rutiniam klonavimui ir plazmidžių be retrovirusinių ir lentivirusinių elementų dauginimui;

Stb13 – naudojamas lentivirusinių ir retrovirusinių plazmidžių dauginimui.

2.2.2. Žmogaus ląstelių linijos

HCT-P (ATCC® CCL-247) – HCT116 tėvinė kolorektalinės karcinomos ląstelių linija;

HCT-P-p53^{-/-} – HCT116 ląstelių linija, išvesta Proteomikos Centro laboratorijoje, su išveiklintu *TP53* genu abiejuose aleliuose;

PC1 ir PC2 – žmogaus kasos vėžinių ląstelių linijos, išvestos Proteomikos Centro laboratorijoje;

HepG2 (ATCC® HB-8065) – žmogaus hepatomos ląstelių linija;

HEK293T (ATCC® CRL-3216) – žmogaus inkstų-embrioninė ląstelių linija, naudojama lentivirusinių vektorių gamybai.

2.2.3. Reagentai bakterijų auginimui, kompetentinių bakterijų paruošimui bei teigiamų transformantų atrankai

LB terpė (10 g/L triptonas, 5 g/L mielių ekstraktas, 10 g/L NaCl tirpalas vandenyje, pH 7,0); kalcio chloridas (Sigma Aldrich); magnio chloridas (Sigma Aldrich); PEG 4000 (Sigma Aldrich); DMSO (Sigma Aldrich); gliukozė (Sigma Aldrich); ampicilino natrio druska (Sigma Aldrich).

2.2.4. Reagentai žmogaus ląstelių kultivavimui

DMEM terpė (ThermoFisher Scientific) (buvo naudojama visoms ląstelių linijoms išskyrus PC1, PC2); IMDM terpė (ThermoFisher Scientific) (buvo naudojama PC1, PC2 ląstelių linijų kultivavimui); FBS (ThermoFisher Scientific); Penicilinas-Streptomicinas (ThermoFisher Scientific); Tripsinas: 500 mL tripsino tirpalo sudaro 496,94 mL PBS, 0,9 g tripsino, 2,16 mL 0,25 M EDTA; doksiciklinas (Sigma Aldrich).

2.2.5. Priešvėžiniai vaistai

Oksaliplatina (Accord Healthcare), 5-fluoruracilas (Accord Healthcare).

2.2.6. MDM2 aktyvumo inhibitoriai

Nutlin3a (Sigma Aldrich).

2.2.7. Reagentai žmogaus ląstelių transfekcijai ir stabilių ląstelių linijų kūrimui

Lipofectamine 3000 (Thermofisher scientific); polibrenas (Thermofisher scientific); puromicinas (Sigma Aldrich).

2.2.8. Rinkiniai DNR išskyrimui ir gryninimui

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZYMORESEARCH).

2.2.9. Rinkiniai PGR

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific), Phire Tissue Direct PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific).

2.2.10. Rinkiniai kolonijų PGR

DreamTaq DNA Polymerase (5 U/ μ L) (ThermoFisher Scientific).

2.2.11. Rinkiniai genų klonavimui

CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific).

2.2.12. Kiti fermentai darbams su DNR

- a) Fosfatazė: FastAP (ThermoFisher Scientific).
- b) Polinukleotidų kinazė: T4 PNK (ThermoFisher Scientific).

- c) DNR ligazė: T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific).
- d) Restrikcijos endonukleazės (ThermoFisher Scientific): Bsp1407I, Bsp119I, EcoRI, XhoI, NheI, Sall, NdeI, BshTI, Eco91I, KpnI, HindIII, NcoI, XbaI, Ecl136II, VspI .

2.2.13. Kiti reagentai ir rinkiniai darbams su DNR

100 mM ATP tirpalas (ThermoFisher Scientific).

2.2.14. Reagentai DNR elektroforezei

TopVision agarozė (ThermoFisher Scientific), Tris (Sigma Aldrich), EDTA (Sigma Aldrich), boro rūgštis (Sigma Aldrich), 6× DNR užnešimo dažai (ThermoFisher Scientific), 10 mg/mL etidžio bromidas (Invitrogen). Naudoti DNR dydžio standartai: GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0333) (ThermoFisher Scientific).

2.2.15. Plazmidės

pCMV-dR8.91 (<https://www.addgene.org/vector-database/2221/>) – lentivirusinė pakavimo plazmidė;

pCMV-VSV-G (Addgene plasmid # 8454) – lentivirusinė apvalkalo plazmidė.

pCW57 (Hygro) (Addgene plasmid # 80922) – "viskas viename" lentivirusinė pernešimo plazmidė stabilių žmogaus ląstelių linijų kūrimui su tikslinio geno indukuojamos ekspresijos galimybe. Turi higromicino atsparumo geną po hPGK promotoriaus kontrole.

pEGFP-C2 (Clontech) (<https://www.addgene.org/vector-database/2488/>) – plazmidė su eGFP genu, skirta ekspresijai žinduolių ląstelėse.

pJET1.2 (ThermoFisher Scientific)

(https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/pJET1.2_blunt) – plazmidė iš CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific) rinkinio.

pKLV-U6gRNA(BbsI)-PGKpuro2ABFP (Addgene plasmid # 50946) – lentivirusinė transferinė plazmidė su puromicino atsparumo ir TagBFP genais po PGK promotoriaus kontrole.

pLJM1-eGFP (Addgene plasmid # 19319) – lentivirusinė pernešimo plazmidė stabilių žmogaus ląstelių linijų kūrimui su eGFP genu, esančiu po CMV promotoriaus kontrole. Taip pat turi puromicino atsparumo geną po hPGK promotoriaus kontrole.

pLJM1-empty (Addgene plasmid # 91980) – seka atitinka pLJM1-eGFP su iškirptu eGFP. Buvo naudojama kontrolinių ląstelių linijų išvedimui.

2.2.16. C57BL/6J pelių kDNR

Gauta iš BCHI Biologinių modelių skyriaus.

kultivuojamos iki 0,6-0,7 OD₆₀₀ optinio tankio 37 °C, 265 rpm sąlygomis. Tuo metu paruošiamas TSS: LB terpė su 10% PEG (Mr = 4000), 20-50 mM MgCl₂ ir 5 % DMSO, pH 6,5-6,8. TSS filtruojamas su 0,22 μm filtru bei atšaldomas ledų vonelėje. Kai bakterijų kultūrų reikiamas optinis tankis pasiekiamas, bakterijų suspensijos perpilamos į sterilius atšaldytus 50 mL mėgintuvėlius bei centrifuguojamos 2700 × g, 4 °C sąlygomis 10 min. Toliau supernatantas nupilamas ir bakterijų nuosėdos resuspenduojamos 2,5 mL TSS, švelniai pipetuojant. Laukiama 10 min. Tada bakterijų suspensijos išfasuojamos po 100 μL į 1,5 mL sterilius atšaldytus mėgintuvėlius bei kuo greičiau užšaldomi -80 °C šaldiklyje. TSS likučiai saugomi -20 °C šaldiklyje (Chung & Miller, 1993).

2.3.2. Chemokompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija ir kolonijų auginimas

Reikiamas kiekis mėgintuvėlių su kompetentinėmis bakterijomis išimamas iš -80 °C ir mėgintuvėliai inkubuojami lede 10 min. Toliau paimama 1-10 μL atitinkamų atšaldytų lede ligavimų mišinių ar plazmidžių tirpalų ir suleidžiama į kompetentinių bakterijų mėgintuvėlius laminarinėje spintoje. Bakterijų suspensijos atsargiai maišomos su pipetmano antgaliu laikant mėgintuvėlius lede. Tada mėgintuvėliai su bakterijomis inkubuojami ledo vonelėje 1 val. Tuomet jie perkeliama į stovą ir į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama 900 μL kambario temperatūros sterilios LB terpės su 20 mM gliukozės. Toliau mėgintuvėliai perkeliama į mėgintuvėlių termostatą su kratyklės funkcija ir kratomi 250 rpm 1 val. Tuo laiku atitinkamas Petri lėkštelių su agarozine LB terpe su ampicilinu kiekis perkeliama į inkubatorių (temperatūra – 37 °C). Pasibaigus inkubacijos laikui, mėgintuvėliai perkeliama į mikrocentrifugą. Centrifugavimo parametrai: 3-5 min, 3000 – 5000 x g. Supernatantas atsargiai dekantuojamas. Nuosėdos resuspenduojamos 200 μL šviežios LB terpės švelniai pipetuojant. Toliau kiekvieno mėgintuvėlio bakterijų suspensija išpilstoma ant atitinkamos Petri lėkštelės agarozinės terpės paviršiaus ir špateliuojama, kol agaras paviršius tampa sausas. Tuomet lėkštelės apverčiamos ir įstatomos į bakterijų inkubatorių 12-36 val. Kai kolonijos pasiekia 1-3 mm dydį, lėkštelės ištraukiamos iš inkubatoriaus, apvyniojamos parafilmu ir įstatomos į 4 °C šaldytuvą (Chung & Miller, 1993).

2.3.3. Transformuotų *E. coli* bakterijų kultūrų auginimas ir plazmidinės DNR gryninimas

Reikiamos Petri lėkštelės su *E. coli* transformantų kolonijomis išimamos iš 4 °C šaldytuvo ir įstatomos į bakterijų inkubatorių 10 min. Pasirinktos kolonijos sunumeruojamos, atsargiai priliečiamos 2,5 μL ar 200 μL steriliais pipetmano antgaliais ir antgaliai įmetami į atitinkamus mėgintuvėlius su LB terpe ir 50-100 μg/mL ampicilino laminarinėje spintoje. Mėgintuvėliai įstatomi į bakterijų kratyklę ir bakterijų kultūros auginamos 12-24 val. 37 °C 265 rpm sąlygomis (terpės skaidrumo praradimas laikomas bakterijų augimo indikatoriumi). Toliau plazmidės gryninamos pagal *QIAprep Spin Miniprep Kit* rinkinio protokolą.

2.3.4. DNR fragmentų gryninimas iš agarozinio gelio, restrikcijų bei PGR mišinių

DNR fragmentų gryninimui iš agarozinio gelio, restrikcijų bei PGR mišinių naudojamas *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* rinkinys. Nors jis nėra rekomenduojamas gryninimui iš restrikcijų bei PGR mišinių, eksperimentai mūsų laboratorijoje parodė, kad jis veikia patikimai gerai: į restrikcijų bei PGR mišinius pridedamas trigubai didesnis ADB buferinio tirpalo tūris, agarozinio gelio tirpymo žingsnis praleidžiamas, mėgintuvėliai su mišiniais vorteksuojami, centrifuguojami ir gryninami. Toliau DNR gryninimas vyko vadovaujantis rinkinio protokolu su viena išimtimi: užnešus praplovimo buferį į kolonėles, jos inkubuojamos 3-5 min kambario temperatūroje ir tik po to centrifuguojamos. Kartais naudojamas *QIAquick Gel Extraction Kit* rinkinys DNR fragmentų valymui iš agarozinio gelio ir restrikcijų mišinių. PGR mišinio atveju vietoj QG buferinio tirpalo naudojamas PB buferinis tirpalas iš *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Tuomet prie PGR mišinio pridedamas penkis kartus didesnis už mišinį PB buferinio tirpalo tūris ir 10 µL 3 M kalio etanoato (pH 5,3) buferinio tirpalo. Toliau gryninimas tęsiamas pagal rinkinio *QIAquick PCR Purification Kit* protokolą.

2.3.5. Analitinės plazmidinės DNR restrikcijos endonukleazėmis

Imama po 1-2,5 µL plazmidžių preparatų ir hidrolizuojama 10 µL bendruose tūriuose. Laikoma, jog įneštas pDNR kiekis ne didesnis nei 0,5 µg, tuomet restrikcijai naudojama po 0,5 µL atitinkamų endonukleazių (10 U restrikcijos endonukleazės – 1 µL). Buferinių tirpalų pasirinkimas atliekamas vadovaujantis atitinkamų endonukleazių gamintojo rekomendacijomis arba ThermoFisher Scientific dvigubų restrikcijų skaičiuotuvu (<https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>). Standartinės endonukleazių restrikcijų sąlygos: 37 °C, 1 val. Reakcija sustabdoma 20 min inkubavimu 65-80 °C laipsnių temperatūroje arba EDTA pridėjimu iki 20 mM galutinės koncentracijos. Toliau mėgintuvėliai saugomi -20 °C šaldiklyje arba iš karto naudojami DNR elektroforezei agaroziniame gelyje su etidžio bromidu.

2.3.6. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje su etidžio bromido dažymu

Priklausomai nuo teorinių fragmentų ilgių ir norimos raiškos naudojami 0,8 - 2,5 % agarozės koncentracijos geliai. Ruošiant 1% agarozės gelį, 1 g agarozės sumaišomas su 100 mL 1 × TBE buferinio tirpalo (100 mM Tris bazės, 100 mM Boro rūgšties, 2 mM EDTA) ir tirpinama mikrobangų krosnelėje su periodiškais pamaišymais. Atvėsus iki 50-60 °C laipsnių, pripilama etidžio bromido iki 0,5-1 µg/mL galutinės koncentracijos. Tuomet skystis kolboje atsargiai

pamaisomas ir išpilstomas į gelio rėmelius su atitinkamomis šukutėmis (naudojamos šukutės, kurios formuoja šulinėlius nuo 15 µL iki 100 µL tūrio). Po 20-40 min kambario temperatūroje (arba po 10-15 min šaldytuve) gelis sustingsta ir yra perkeliamas į DNR elektroforezės aparatą, šukutės ištraukiamos. Elektroforezės aparate laikomas 1 × TBE buferinis tirpalas. DNR pavyzdžiai sumaišomi su 6 × užnešimo dažais iki 1 × koncentracijos, vorteksuojami ir nusukami, užnešami į gelio šulinėlius. Elektroforezės sąlygos: 100-200 V, 0,5-6 val. Jei elektroforezė preparatyvi, naudojamas portatyvinis 360 nm ultravioletinės šviesos šaltinis, atitinkamos DNR juostelės kuo greičiau išpjaunamos ir perkeliamos į 1,5 mL mėgintuvėlius, toliau gryninamos naudojant atitinkamus rinkinius (skyrius). Jei elektroforezė analitinė, perkeliamas į transiliuminatorių su 312 nm ultravioletinės šviesos šaltiniu ir fotografuojamas.

2.3.7. Pradmenų ir kitų nukleotidų dizaininimas, PGR ir klonavimas in silico, plazmidžių sekų talpinimas ir sekoskaitos rezultatų vizualizavimas

Programos Benchling (<https://benchling.com>) ir SnapGene viewer (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>).

2.3.8. Sekoskaita

Sekoskaita buvo atlikta Macrogen (<https://dna.macrogen.com/>) bei Azenta (<https://www.azenta.com/>) įmonėse.

2.3.9. Oligonukleotidų sintezė

Oligonukleotidų sintezė buvo atlikta įmonėje Metabion (<https://www.metabion.com/>).

2.3.10. Oligonukleotidų sulydymas

Oligonukleotidai buvo ištirpinami NF H₂O kambario temperatūroje iki 100 µM koncentracijos. Toliau atitinkami komplementarūs oligonukleotidai buvo maišomi ir pridedami į sulydymo buferį (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl (pH 8.0)) iki 10 µM galutinės koncentracijos (abiejų oligonukleotidų). Toliau oligonukleotidai buvo sulydomi naudojant programą: inkubavimo laikas 95 °C temperatūroje – 5 min, po to temperatūros sumažėjimas per 1 °C/min iki 25 °C. Po programos pabaigos sulydyti oligonukleotidai buvo laikomi -20 °C šaldiklyje.

2.3.11. DNR koncentracijos matavimas

DNR koncentracijos matavimai buvo atlikti naudojant Nanodrop (Thermofisher scientific) prietaisą.

2.3.12. Kolonijų PGR

pJET1.2-p53 konstrukčių kolonijų PGR buvo atliktas pagal *CloneJET PCR Cloning Kit* rinkinio rekomendacijas, naudojant *DreamTaq DNA Polymerase (5 U/μL)* rinkinį.

2.3.13. pCW57 (Puro) konstravimas

Siekiant stabilių ląstelių linijų išvedimą supaprastinti, sumažinti kainą bei pagreitinti, buvo pakeistas higromicino atsparumo genas į puromicino atsparumo geną pCW57 (Hygro) plazmidėje. Buvo atlikta PGR, panaudojant hPGK_Fw_Bsp1407I ir PuroR_Rev_Bsp119I pradmenis ir pLJM1-EGFP plazmidę, panaudojant kaip matricą. PGR mišinys buvo supilstytas pagal *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* rinkinio gamintojo rekomendacijas (2.3.13.1a lentelė.). Termociklerio programa taip pat buvo parinkta pagal gamintojo rekomendacijas (2.3.13.1b lentelė.).

2.3.13.1a lentelė. Pilstymo instrukcijos

Reagentas	Tūris (μL)
NF H ₂ O	12
5 x Phusion HF buffer	4
2 mM dNTPs	2
10 μM 1 pradmens	0,5
10 μM 2 pradmens	0,5
100 ng/μL pLJM1-eGFP	0,2
DMSO	0,6
Phusion	0,2

2.3.13.1b lentelė. Termociklerio programa

Žingsnio pavadinimas	Temperatūra (°C)	Laikas	Kartojimai
Pradinė denatūracija	98	3 min	1
Denatūracija	98	10 s	35
Sulydymas	72	10 s	
Elongacija	72	15 s	
Galutinė elongacija	72	10 min	1
Laikymas	4	-	1

Atlikus PGR, buvo gautas hPGK promotoriaus ir puromicino atsparumo geno amplifikacijos produktas su įvestais restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvais: iš 5' – Bsp1407I, iš 3' – Bsp119I. Be to, puromicino atsparumo geno STOP kodonas buvo panaikintas. Toliau jis buvo klonuotas į pCW57 (Hygro) plazmidę, iškirpus higromicino atsparumo geną naudojant tas pačias restrikcijos endonukleazes. Keletas klonų buvo nusiųsti sekoskaitai (kaip papildomas sekoskaitos

pradmuo buvo panaudotas hPGK-F). Buvo gauti 6 teigiami klonai. Tolimesniems darbams pasirinktas 5 klonas.

2.3.14. pEGFP-C2-PEST konstravimas

Buvo atliktas PGR su PEST_XhoI_Fw ir PEST_EcoRI_Rev pradmenimis, pelių kDNR naudojant kaip matricą su *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/μL) rinkiniu. Pilstymo instrukcijos bei termociklerio programa buvo parinktos pagal gamintojo rekomendacijas. Tokiu būdu buvo padaugintas pelių *ODCI* geno regionas, atsakingas už greitą baltymo degradaciją, bei iš 5' galo buvo įvesta XhoI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seka, iš 3' – EcoRI restrikcijos endonukleazės atpažinimo seka taip, kad įklonuotas fragmentas tęstų eGFP geno skaitymo rėmelį (regionas buvo įklonuotas į eGFP C-galą). Toliau šitas regionas buvo įklonuotas į pEGFP-C2 plazmidę per atitinkamus restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus. 2 klonai buvo nusiųsti sekoskaitai. Abu klonai buvo teigiami.

2.3. 15. pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP konstravimas

Tam, kad būtų galima patikrinti, ar gautas deGFP (eGFP-PEST) konstruktas veikia, jis ir eGFP buvo subklonuojami į indukuojamą vektorių su puromicino atsparumo genu. Tuomet eGFP bei deGFP sekos buvo iškirptos iš atitinkamų vektorių panaudojant NheI, XhoI ir NheI, Sall restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus ir įklonuotos į pCW57 (Puro) vektorių per NheI ir Sall restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus (Sall ir XhoI turi atitinkamus lipnius galus).

2.3.16. pJET-P21p konstravimas

CDKN1A geno (koduoja P21 baltymą) promotoriaus regionas, turintis 2 P53 atpažinimo elementus buvo padaugintas naudojant *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (2 U/μL) rinkinį. Kaip pradmenys buvo panaudoti P21p_NdeI_Bsp119I_Fw2 ir P21p_NheI_Rev2 oligonukleotidai, kaip matrica – autoriaus burnos gleivinės ląstelių lizatas, gautas panaudojant *Phire Tissue Direct PCR Master Mix* rinkinį. Pilstymo instrukcijos bei termociklerio programa buvo parinktos pagal gamintojo rekomendacijas (2.3.16.1 lentelė.). Amplifikuojant P21 promotoriaus regioną, buvo įvesti atitinkamų restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvai: iš 5' – NdeI bei Bsp119I, iš 3' – NheI. Kadangi Phusion polimerazės amplifikavimo produktas turi bukus galus, buvo pritaikytas *CloneJET PCR Cloning Kit* rinkinys. PGR produkto klonavimas į pJET1.2 vektorių buvo atliktas pagal gamintojo rekomendacijas. 2 klonai buvo nusiųsti sekoskaitai. Kadangi klonuotas P21 promotoriaus regionas yra pakankamai ilgas (2,4 kb), buvo panaudoti papildomi sekoskaitos pradmenys: p21prom_seq1 ir p21prom_seq2. 3 klonas buvo teigiamas (nors ir turėjo 2 pavienių nukleotidų pakeitimus).

2.3.16.1a lentelė. Pilstymo instrukcijos

Reagentas	Tūris (μL)
NF H ₂ O	31
5 x Phusion HF buffer	10
10 mM dNTPs	1
10 μM 1 pradmens	2,5
10 μM 2 pradmens	2,5
Ląstelių lizatas	2
Phusion	1

2.3.16.1b lentelė. Termociklerio programa

Žingsnio pavadinimas	Temperatūra (°C)	Laikas	Kartojimai
Pradinė denatūracija	98	3 min	1
Denatūracija	98	10 s	35
Sulydymas	68,3	30 s	
Elongacija	72	75 s	
Galutinė elongacija	72	10 min	1
Laikymas	4	-	1

2.3.17. pLJM1-deGFP (pLJM1-eGFP-PEST) konstravimas

eGFP seka iš pLJM1-eGFP plazmidės buvo pakeista į deGFP seką iš pEGFP-C2-PEST vektoriaus panaudojus EcoRI bei NheI restrikcijos endonukleazes.

2.3.18. pLJM1-P21p-eGFP ir pLJM1-P21p-deGFP konstravimas

P21 promotoriaus regionas buvo iškirptas iš pJET-P21p plazmidės panaudojus NheI bei NdeI restrikcijos endonukleazes bei įklonuotas per tų pačių restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus į pLJM1-eGFP bei pLJM1-deGFP vektorius, pakeitus CMV promotorių.

2.3.19. pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP konstravimas

Kadangi pLJM1-P21p-eGFP ir pLJM1-P21p-deGFP vektorių trūkumas buvo tame, jog nebuvo galima įvertinti provirusų, patekusių į ląstelę, skaičiaus, buvo nuspręsta pridėti kitą fluorescencinio baltymo seką (TagBFP) po puromicino atsparumo geno, kuris stovi po konstitutyvaus hPGK promotoriaus kontrole. Tuomet buvo pasirinkta pKLV-U6gRNA(BbsI)-PGKpuro2ABFP plazmidė, kuri turi puromicino atsparumo geno seką sulietą su TagBFP seka per T2A peptidą. Toliau puromicino atsparumo geno dalis buvo iškirpta iš pLJM1-eGFP bei pLJM1-deGFP plazmidžių per Eco91I bei KpnI restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus, bei pakeistas į atitinkamą seką su TagBFP, iškirptą per tuos pačius motyvus iš pKLV-U6gRNA(BbsI)-

PGKpuro2ABFP plazmidės (Eco91I atpažinimo motyvas yra puromicino atsparumo geno viduryje, o KpnI atpažinimo motyvas – iš karto po STOP kodono).

2.3.20. pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA,

pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod,

bei plazmidžių deGFP versijų konstravimas

YB_TATA bei minCMVmod – minimalūs (šerdiniai) promotoriai, kuriuos buvo nuspręsta panaudoti su atitinkamais P53 atpažinimo elementais. Šie promotoriai buvo užsakyti komplementarių oligonukleotidų pavidalu, kuriuos sulydžius gaunami DNR dupleksai, turintys iš 5' galo BshTI restrikcijos endonukleazės lipnų galą, o iš 3' – NheI restrikcijos endonukleazės. Tuomet YB_TATA promotoriaus oligonukleotidai (YB_TATA-1 ir YB_TATA-2) buvo sulydyti kaip aprašyta aukščiau ir įklonuoti per šių restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus į pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP plazmidės iš eGFP/deGFP sekų 5' galo ir CMV promotoriaus sekos 3' galo. Tačiau, klonuojant minCMVmod promotorių buvo pasirinktas sudėtingesnis kelias: minCMVmod promotorius buvo padalintas į 2 dalis per vidurį tam, kad būtų galima netaikyti HPLC gryninimo sintetinant oligonukleotidus (iki 40 nt jo dar nereikia) (žymiai sumažina sintezės kainą). Tuomet sulydus minCMVmod-1a bei minCMVmod-1b oligonukleotidus buvo gautas DNR dupleksas, kuris turi iš 5' galo BshTI lipnų galą, o iš 3' – tiesiog 4 nukleotidų 5' iškišą. Atitinkamai sulidžius minCMVmod-2a bei minCMVmod-2b oligonukleotidus buvo gautas dupleksas, kuris turi iš 5' galo atitinkamą 5' 4 nukleotidų iškišą, o iš 3' – NheI lipnų galą. Tuomet minCMVmod promotoriaus įvedimas buvo atliktas tokiu būdu: iš pradžių į karpytų plazmidžių ligavimo mišinį buvo pridėti abu minCMVmod dupleksai moliniu santykiu 1:500 (plazmidė:dupleksas) ir buvo atlikta ligavimo reakcija. Po to ligavimo produktai buvo išgryninti aukščiau aprašytu metodu, buvo fosforilinti su T4 PNK ir gauti produktai iš naujo išgryninti bei suliguoti. Toks konstravimo būdas buvo pritaikytas tam, kad išvengti trumpų DNR duplexų polimerų formavimosi.

2.3.21. Modifikuoto P53 reporterio versijų galutinių konstrukto sukūrimas

Į konstrukto, aprašytus ankstesniame skyrelyje buvo įvestos oligonukleotidų sekos, turinčios 1 arba 3 P53 atsako elementus iš 5' galo nuo minimalių promotorių sekų, panaudojant NdeI bei BshTI restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus (tuo tarpu iškirpus CMV promotorių per juos). 1×RE_P53 įvedimas (P21_RE-1 ir P21_RE-2 oligonukleotidai) buvo analogiškas YB_TATA minimalaus promotoriaus įvedimui. 3×RE_P53 (TRIPLE_RE-1a, TRIPLE_RE-1b, TRIPLE_RE-2a, TRIPLE_RE-2b oligonukleotidai) įvedimas buvo analogiškas minCMVmod minimalaus promotoriaus įvedimui. Tačiau, reikėtų paminėti būdą, kaip buvo gauti kontroliniai konstrukto,

neturintys P53 atsako elementų: pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV, pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV, pLJM1-deGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV, pLJM1-deGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV. Buvo pritaikyta tokia strategija: po CMV promotoriaus iškirpimo per NdeI ir BshTI restrikcijos endonukleazių atpažinimo motyvus, lipnūs galai buvo užbukinti, panaudojant bukinimo fermentą (*DNA Blunting Enzyme*) iš *CloneJET PCR Cloning Kit*. Toliau linijiniai reakcijos produktai buvo autoliguoti ir transformuoti. Sekoskaitai buvo nusiųsta po 1 kloną kiekvieno konstrukto. Kaip sekoskaitos pradmuo buvo panaudotas hU6_FW. Visi klonai buvo teigiami.

2.3.22. pJET-P53 konstravimas P53 sekoskaitai

Kadangi buvo nuspręsta atlikti PC1 ir PC2 ląstelių linijų P53 geno koduojančios srities sekoskaitą, buvo pasirinkta tokia strategija: iš pradžių P53 genas buvo padaugintas, panaudojant *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* rinkinį. Kaip matrica buvo panaudota nurodytų linijų kDNR, kaip pradmenys – P53_a_Fw_II ir P53_a_Rv oligonukleotidai. PGR pilstymo instrukcijos bei termociklerio programa buvo parinktos pagal gamintojo rekomendacijas. Tuomet P53 PGR produktai buvo klonuoti į pJET1.2 plazmidę pagal rinkinio *CloneJET PCR Cloning Kit* gamintojo rekomendacijas. Teigiamos kolonijos buvo nustatytos panaudojant kolonijų PGR kaip aprašyta aukščiau. Sekoskaitai buvo nusiųsti kiekvienos PC linijos – 3 klonai.

2.3.23. Žmogaus ląstelių kultivavimo sąlygos ir persėjimas

Kultivavimo sąlygos

37 °C, 95 % CO₂, 5 % O₂. Ląstelės persėjamos, kai pasiekia 70-100 % konfluencijos.

Persėjimas

Prieš persėjant ląsteles patikrinama, kaip auga ląstelės: ar neužsikrėtė, ar būtina persėti, ar pakanka, norint sėti eksperimentui. Įsitikinus, kad ląsteles galima persėti, pašildomos terpės ir tripsinas bent 15 minučių 37 °C vandens vonelėje. Išsterilinamas laminaras 5 minutes su UV. Stalo paviršius nuvalomas su 70 % etanoliu. Nuo ląstelių nusiurbiamą terpę ir ląstelės du kartus praplaunamos su PBS (d6 cm lėkštei naudojama 2-3 mL PBS). PBS nusiurbiamas, ant ląstelių užpilamas tripsinas (apie 1 mL d6 cm lėkštei) ir nusiurbiamas. Palaukiama kol ląstelės atkibs nuo paviršiaus (0,5-10 min priklausomai nuo konfluencijos ir nuo ląstelių linijos). Atlipusios ląstelės suspenduojamos 5 mL kultivavimo terpėje. Po resuspendavimo 0,5 mL suspensijos perpilama į naują lėkštelę ir užpilama 4,5 mL naujos terpės.

2.3.24. Žmogaus HEK293T ląstelių linijos transfekcija lentivirusinių vektorių gamybai

Buvo panaudotos transferinės plazmidės su atitinkamais konstruktais, pCMV-dR8.91 ir pCMV-VSV-G plazmidės santykiu 2 : 1,2 : 0,8 (μg). Transfekcija atlikta pagal *Lipofectamine 3000* gamintojo rekomendacijas.

2.3.25. Ląstelių linijų lentivirusinė transdukcija

Po 16-18 val. nuo HEK293T ląstelių transfekcijos pradžios, terpė su lipofektaminu buvo pakeista į DMEM su 20 % FBS. Po 24 val. nuo terpės keitimo, nauja terpė buvo surinkta į stiklinį mėgintuvėlį, sumaišyta su polibrenu iki 8 μg/mL galutinės koncentracijos, filtruota per 0,45 μm filtrą ir užnešta į atitinkamus šulinėlius su atitinkamų linijų ląstelėmis (24 šulinėlių plokštelė, konfluencijos laipsnis – 30-40 %). Tuomet taikininėms ląstelėms buvo leista atsigauti 24 val. standartinėje terpėje (DMEM su 10 % FBS arba IMDM su 10 % FBS) be lentivirusinių vektorių ir pradėta atranka su puomicinu.

2.3.26. Transdukuotų ląstelių atranka su puomicinu

Į terpę buvo pridėta puomicino iki tam tikros galutinės koncentracijos (2.3.26.1a lentelė.). Palaukus 48 val. visos neatsparios ląstelės žuvo. Ląstelių linijos nebuvo subklonuotos ir pavadintos atitinkamai (2.3.26.1b lentelė.).

2.3.26.1a lentelė. Taikytos puomicino koncentracijos priklausomai nuo ląstelių linijų

Ląstelių linija	Puomicino koncentracija (μg/mL)
HCT-P	2
HCT-P-p53 ^{-/-}	2
HepG2	1
PC1	5
PC2	3

2.3.26.1b lentelė. Išvestų ląstelių linijų pavadinimai priklausomai nuo transdukuotų konstrukty

Tėvinė linija	Transdukuotas konstruktas	Išvestos linijos pavadinimas	
HCT-P	pCW57 (Puro)	HCT-P-pCW57	
	pCW57 (Puro)-eGFP	HCT-P-ieGFP	
	pCW57 (Puro)-deGFP	HCT-P-ideGFP	
	pLJM1-empty	HCT-P-pLJM1/CMV	
	pLJM1-P21p-eGFP	HCT-P-P21p-eGFP	
	pLJM1-P21p-deGFP	HCT-P-P21p-deGFP	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV	HCT-P-YB_TATA	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV-1×RE_P53	HCT-P-1×RE_P53-YB_TATA	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV-3×RE_P53	HCT-P-3×RE_P53-YB_TATA	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV	HCT-P-minCMVmod	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV-1×RE_P53	HCT-P-1×RE_P53-minCMVmod	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV-3×RE_P53	HCT-P-3×RE_P53-minCMVmod	
HCT-P-p53 ^{-/-}	pLJM1-empty	HCT-P-p53 ^{-/-} -pLJM1/CMV	
	pLJM1-P21p-eGFP	HCT-P-p53 ^{-/-} -P21p-eGFP	
	pLJM1-P21p-deGFP	HCT-P-p53 ^{-/-} -P21p-deGFP	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV	HCT-P-p53 ^{-/-} -YB_TATA	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV-1×RE_P53	HCT-P-p53 ^{-/-} -1×RE_P53-YB_TATA	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA-ΔCMV-3×RE_P53	HCT-P-p53 ^{-/-} -3×RE_P53-YB_TATA	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV	HCT-P-p53 ^{-/-} -minCMVmod	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV-1×RE_P53	HCT-P-p53 ^{-/-} -1×RE_P53-minCMVmod	
	pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod-ΔCMV-3×RE_P53	HCT-P-p53 ^{-/-} -3×RE_P53-minCMVmod	
	HepG2	pLJM1-empty	HepG2-pLJM1/CMV
		pLJM1-P21p-eGFP	HepG2-P21p-eGFP
		pLJM1-P21p-deGFP	HepG2-P21p-deGFP
PC1	pLJM1-empty	PC1-pLJM1/CMV	
	pLJM1-P21p-eGFP	PC1-P21p-eGFP	
	pLJM1-P21p-deGFP	PC1-P21p-deGFP	
PC2	pLJM1-empty	PC2-pLJM1/CMV	
	pLJM1-P21p-eGFP	PC2-P21p-eGFP	
	pLJM1-P21p-deGFP	PC2-P21p-deGFP	

2.3.27. Žmogaus ląstelių eGFP signalo vertinimas naudojant tėkmės citometriją

Ląstelės užsėjamos į 24 šulinėlių plokšteles (50000 ląstelių į vieną šulinėlį). Po 24 valandų daromi poveikiai vaistais. Prieš darant poveikius ląstelių būklė įvertinama morfologiškai: ar ląstelės neužsikrėtė, ar konfluencija vienoda. Toliau ląstelės kultivuojamos numatytą laiką. Pasibaigus poveikių laikui, ląstelės išimamos iš inkubatoriaus ir visos kitos operacijos atliekamos kambario temperatūroje nesteriliomis sąlygomis. Terpės iš šulinėlių perpilamos į atitinkamai sužymėtus mėgintuvėlius. Tuomet ląstelės kiekviename šulinėlyje praplaunamos su 200 μL PBS. PBS po plovimų irgi supilamas į atitinkamus mėgintuvėlius. Tada ląstelės paveikiamos tripsinu ir resuspenduojamos su terpės ir PBS mišiniais iš atitinkamų mėgintuvėlių bei ląstelių suspensijos supilamos į tuos pačius mėgintuvėlius. Atliekamas centrifugavimas 3 min, 1000 × g. Tada

supernatantas atsargiai dekantuojamas ir ląstelės švelniai resuspenduojamos 0,2-1 mL PBSo. Resuspendavus, į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama 2-10 μ L 50 μ g/mL propidžio jodido tirpalo PBSe ir ląstelių suspensija švelniai pipetuojama. Tuomet ląstelių suspensijos pilamos į 96 šulinėlių šulinėlių plokštelę. Nedelsiant matuojama tėkmės citometru, kol ląstelės nespėjo nusėsti. Matavimai atliekami pagal gamintojo rekomendacijas bei iš anksto atrinktas sąlygas. Rezultatai analizuojami Flowing Software programa.

2.3.28. Tėkmės citometrijos duomenų statistinė analizė

Tėkmės citometrijos duomenų statistinė analizė buvo atlikta programoje Excel (Microsoft).

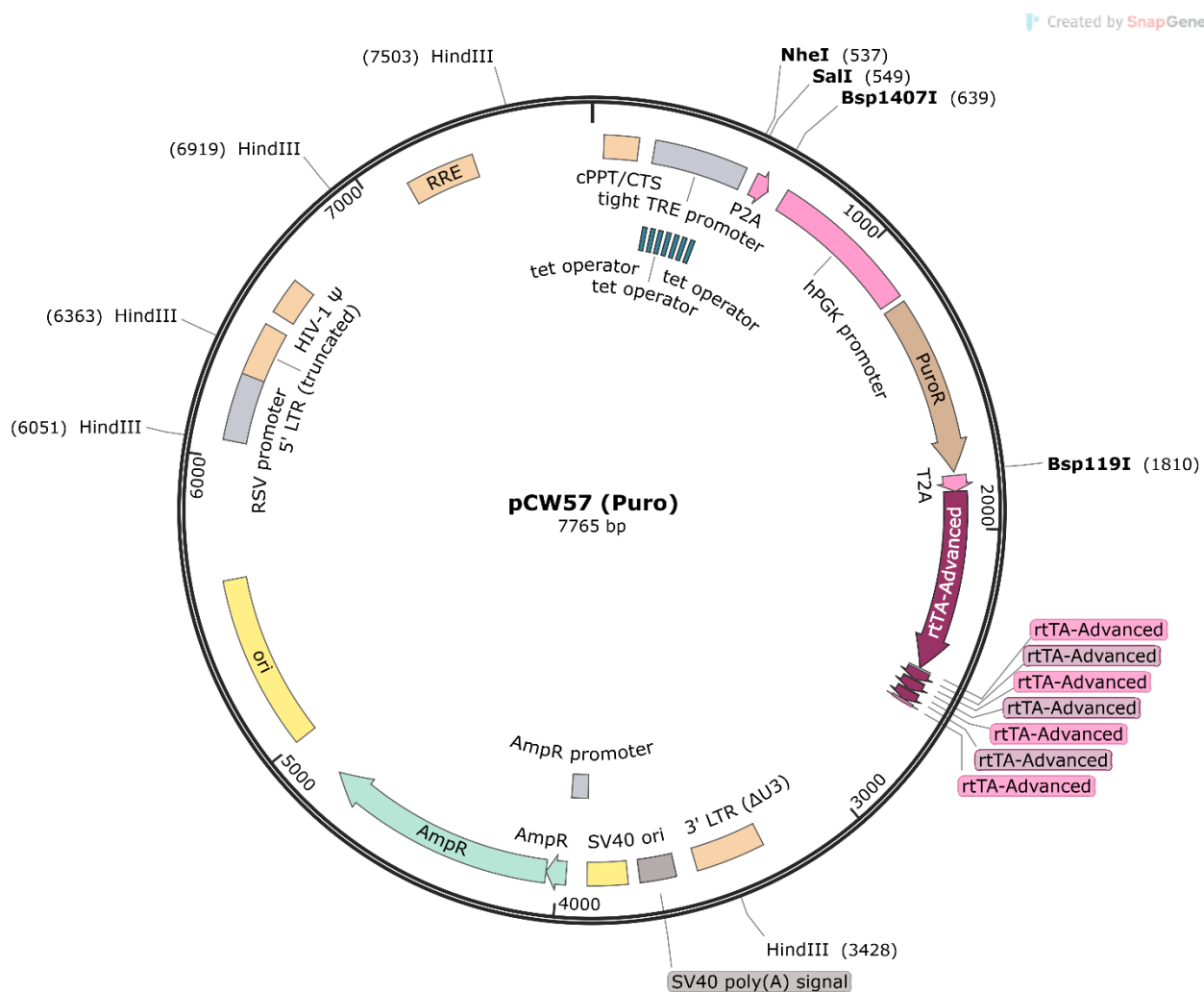
2. REZULTATAI

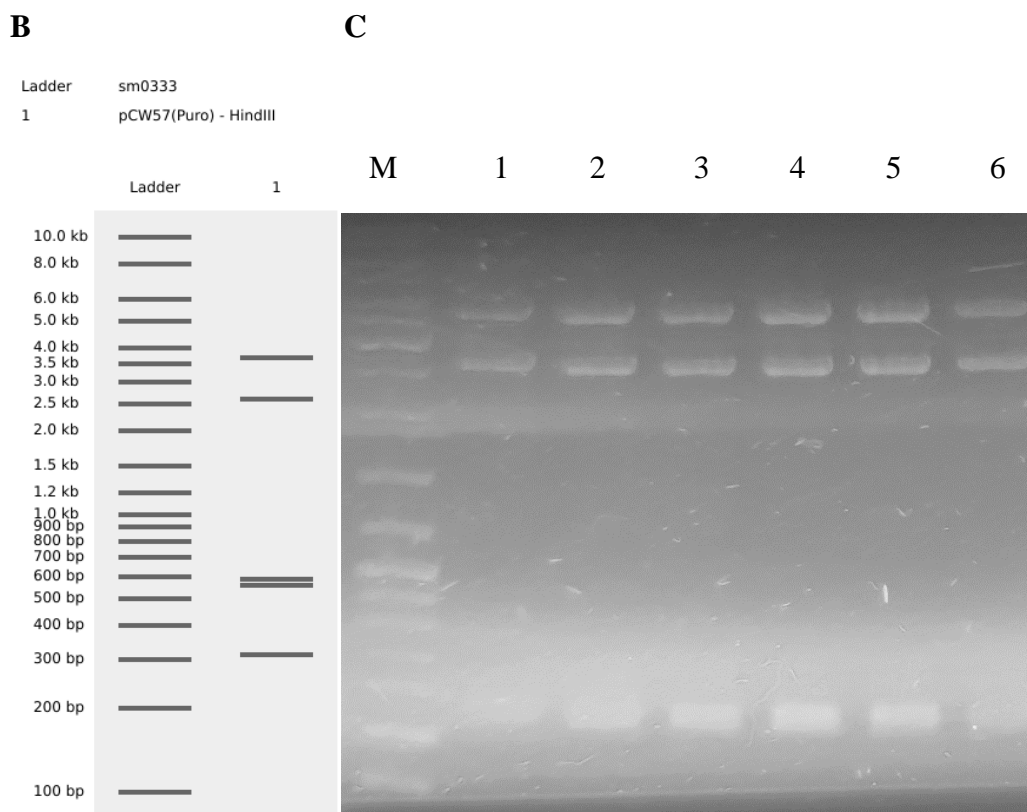
3.1. pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP konstravimas ir PEST sekos veiklumo įvertinimas

3.1.1. pCW57 (Puro) konstravimas

Siekiant stabilių linijų išvedimą supaprastinti, sumažinti išlaidas ir pagreitininti, higromicino atsparumo genas pCW57 (Hygro) plazmidėje (reprezentuoja „TET ON“ pilnavertišką sistemą) buvo pakeistas į puomicino atsparumo geną. 6 klonai buvo patikrinti, naudojant restrikcinę analizę su HindIII (3.1.1.1c pav.) ir sulyginti su virtualios restrikcinės analizės rezultatais (3.1.1.1b pav.).

A





3.1.1.1 pav. A – pCW57 (Puro) plazmidės restrikcinis žemėlapis. TET ON sistema, pavaizduota paveiksle, veikia tokiu būdu: konstitutyvus hPGK promotorių priverčia ekspresuoti rtTA-Advanced geną, kurio produktas sąveikaujant su doksiciklinu jungiasi prie TRE promotoriaus ir pradeda genų ekspresiją, kurie randasi po to promotoriaus (šiuo atveju, ju nėra).

B – pCW57 (Puro) restrikcinė analizė su HindIII *in silico*,

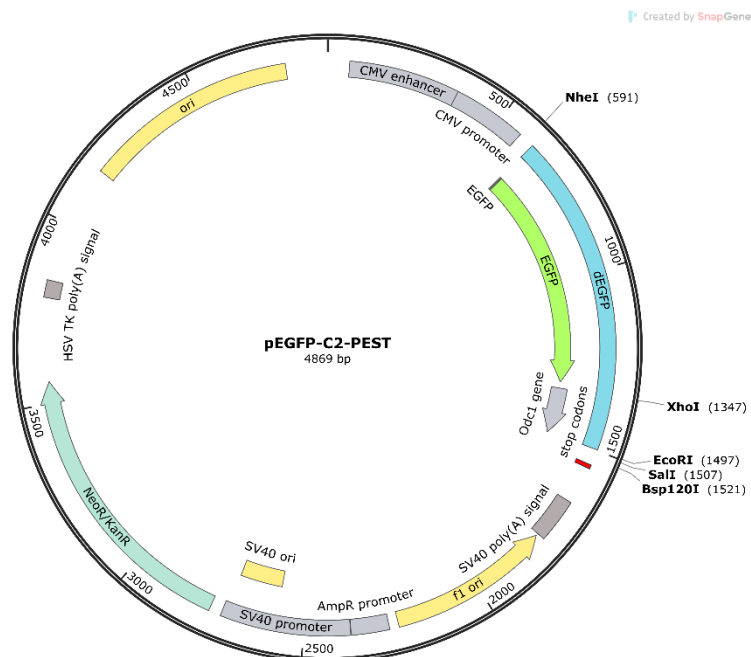
C – Gautų klonų restrikcinės analizės su HindIII rezultatų vizualizavimas naudojant DNR elektroforezę 1% agaroziniame gelyje. M – DNR markeris sm0333. 1, 2, 3, 4, 5, 6 – pCW57(Puro) plazmidės klonų numeriai.

Rezultatai parodė, jog visi klonai teigiami. 5 klonas buvo nusiųstas sekoskaitai. Jis ir buvo naudojamas tolimesniuose darbuose. Gauta plazmidė buvo pavadinta pCW57 (Puro) (13.1.1.1a pav.).

3.1.2 pEGFP-C2-PEST konstravimas

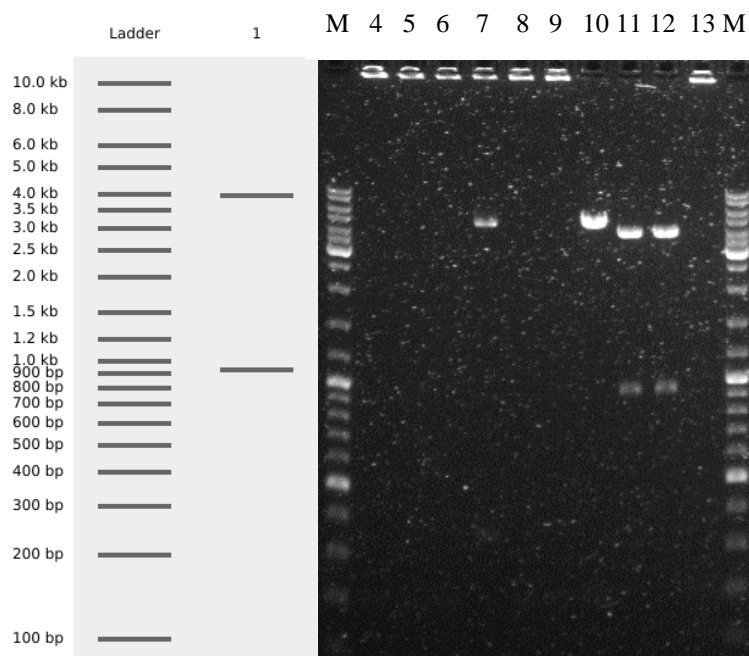
eGFP turi labai ilgą pusėjimo laiką žinduolių ląstelėse (Li et al, 1998; Corish & Tyler-Smith, 1999). Todėl siekiant, kad būtų padidintas reporterio jautrumas P53 kiekio pokyčiams, buvo nuspręsta reporteryje naudoti deGFP. Taigi, visų pirma, PEST seka buvo klonuojama iš pelių *ODC1* geno ir įvedama į pEGFP-C2 vektoriaus eGFP skaitymo rėmelio pabaigą. Konstruktas buvo pavadintas pEGFP-C2-PEST (3.1.2.1a pav.).

A



B

Ladder sm0333
1 pEGFP-C2-PEST - Bsp120I Nhe



C

3.1.2.1 pav. A – pEGFP-C2-PEST plazmidės restrikcinis žemėlapis;
B – pEGFP-C2-PEST plazmidės restrikcinė analizė su Bsp120I ir NheI *in silico*;
C – Gautų klonų restrikcinės analizės su Bsp120I ir NheI rezultatų vizualizavimas naudojant DNR elektroforezę 1% agaroziniame gelyje. M – atitinka takelius su DNR markeriu SM0333. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 – pEGFP-C2-PEST plazmidės atitinkami klonai.

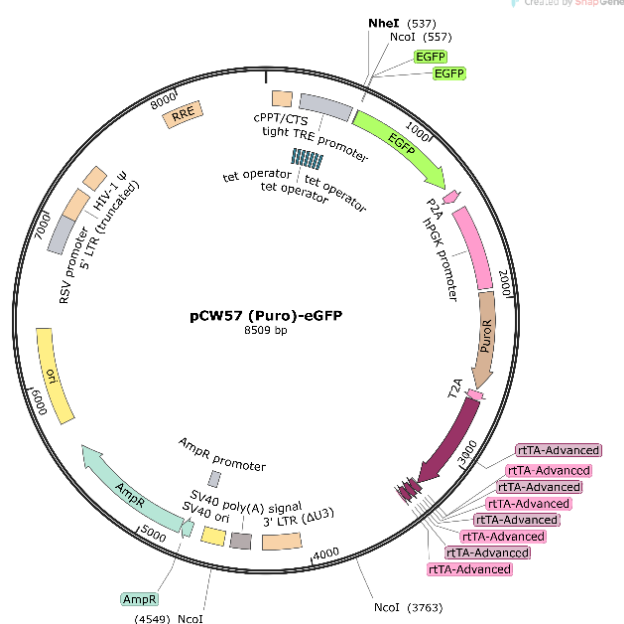
13 klonų buvo patikrinti restrikcine analize naudojant NheI bei Bsp120I (3.1.2.1b pav.) ir sulyginti su virtualios restrikcijos rezultatais (3.1.2.1c pav.). 11 ir 12 klonai buvo teigiami ir nusiūsti sekoskaitai. Sekoskaita patvirtino, kad abu klonai yra teigiami.

3.1.3. pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP konstravimas

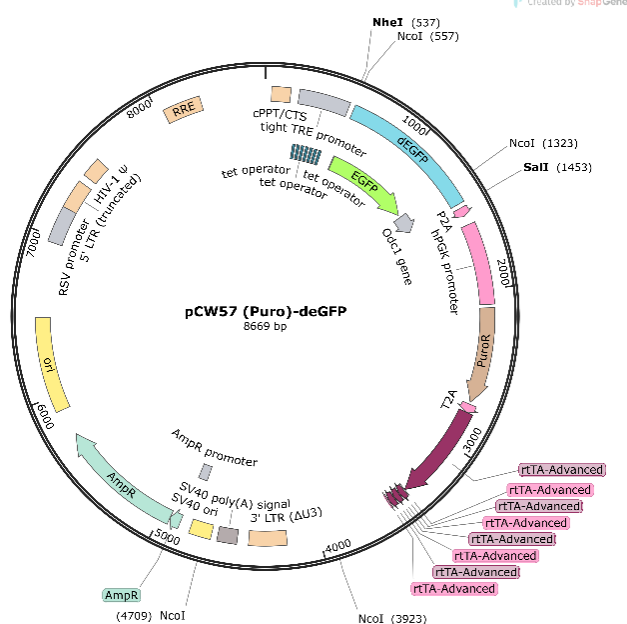
Siekiant patikrinti PEST sekos veiklumą, reikia subklonuoti eGFP bei deGFP sekas į transferinę lentivirusinę plazmidę su „TET ON“ sistema, įvesti gautus konstruktus į HCT-P ląsteles, indukuoti eGFP bei deGFP raiškas ir sulyginti eGFP bei deGFP fluorescencijos intensyvumus ląstelėse.

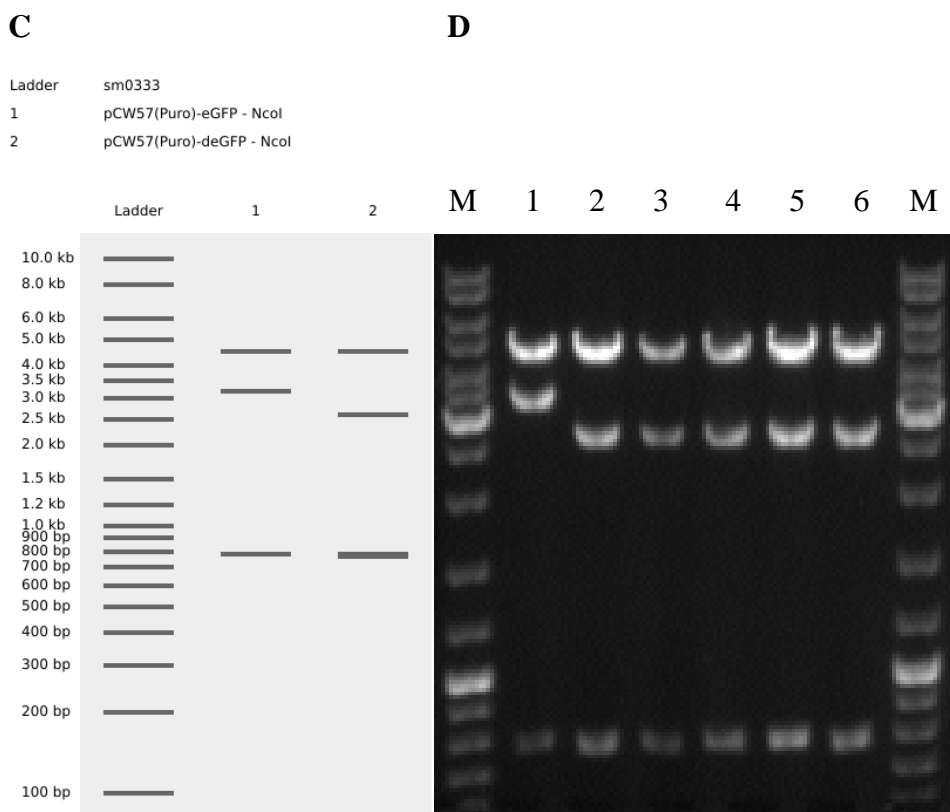
Taigi, eGFP bei deGFP sekos buvo iškirptos iš atitinkamai pEGFP-C2 ir pEGFP-C2-PEST vektorių, bei įvestos į pCW57 (Puro) vektorių. Po restrikcijos su NcoI paaiškėjo, jog pCW57 (Puro)-eGFP plazmidės buvo gautas 1 teigiamas klonas, o pCW57 (Puro)-deGFP – 5 (3.1.3.1 pav.).

A



B





3.1.3.1 pav. A – pCW57 (Puro)-eGFP restrikcinis žemėlapis;

B – pCW57 (Puro)-deGFP restrikcinis žemėlapis;

C – pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP restrikcinė analizė su NcoI *in silico*;

D – pCW57 (Puro)-eGFP bei pCW57 (Puro)-deGFP plazmidžių klonų restrikcinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 1% agaroziniame gelyje

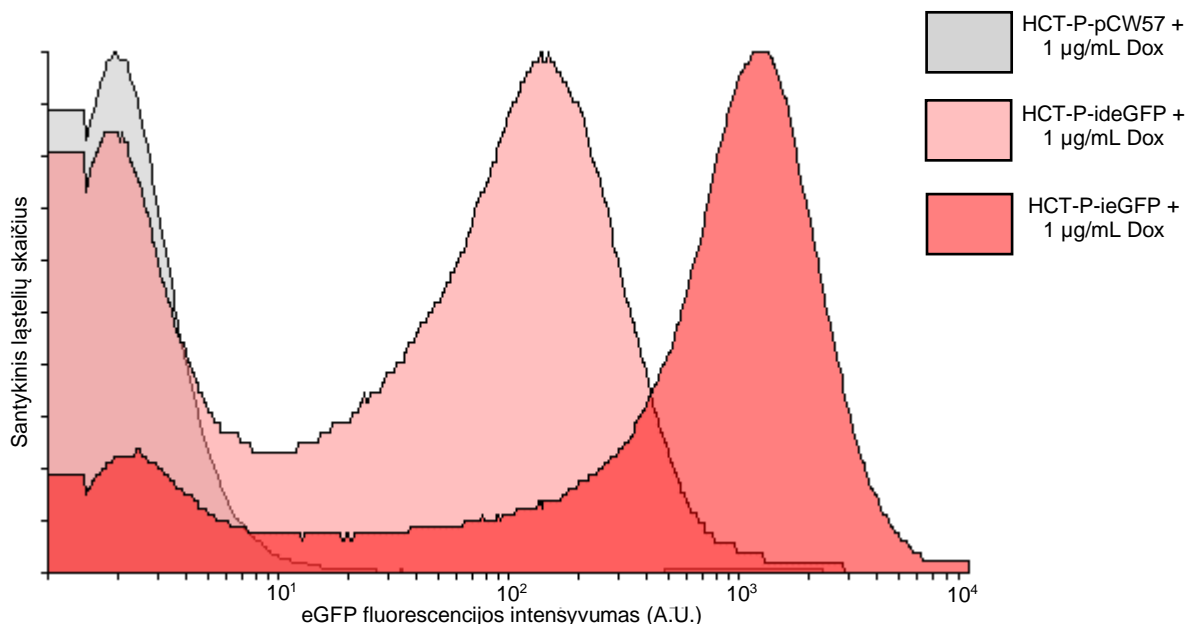
M – atitinka takelius su markeriu sm0333; 1 takelis atitinka pCW57 (Puro)-eGFP vieno klonu restrikcinės analizės rezultatus; 2-6 takeliai atitinka pCW57 (Puro)-deGFP klonų restrikcinės analizės rezultatus.

Lentivirusinei transdukcijai buvo panaudoti pCW57 (Puro)-eGFP 1 klonas ir pCW57 (Puro)-deGFP 2 klonas.

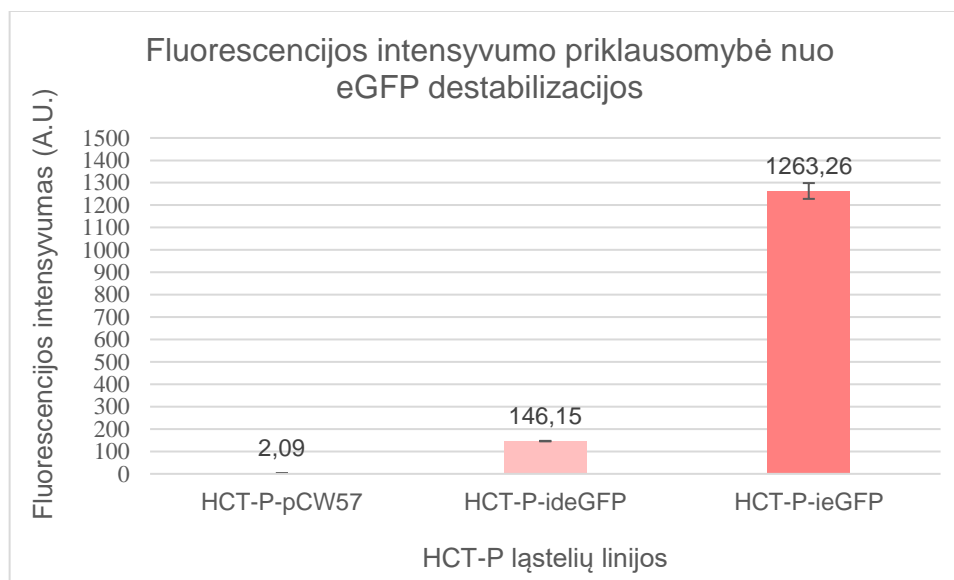
3.1.4. Indukuotų eGFP ir deGFP fluorescencijos intensyvumų palyginimai

Tam, kad būtų užtikrinta, jog *ODCI* geno fragmentas destabilizuoja eGFP, buvo atliktas atitinkamų linijų išvedimas (HCT-P-pCW57, HCT-P-ideGFP, HCT-P-ieGFP) ir indukcija su doksiciklinu (3.1.4.1 pav.).

A



B



3.1.4.1 pav. eGFP ir deGFP signalų intensyvumų palyginimas tarp skirtingų linijų po 48 val. ekspresijos indukcijos su 1 µg/mL doksiciklino:

A - tėkmės citometrijos duomenų reprezentatyvi histograma;

B – grafikas su 3 techninių pakartojimų vidurkiu ir standartinėmis paklaidomis

Kaip matoma iš 3.1.4.1 pav., HCT-P-ideGFP ląstelių linijos eGFP signalo intensyvumas dramatiškai mažesnis negu HCT-P-ieGFP linijos, bet pakankamai skiriasi nuo linijos su tuščiu

vektoriūmi HCT-P-pCW57. Nors galutinei išvadai truksta trijų biologinių pakartojimų, panašu, jog pridėtas *ODC1* geno fragmentas su didele tikimybe pagreitina eGFP degradavimą.

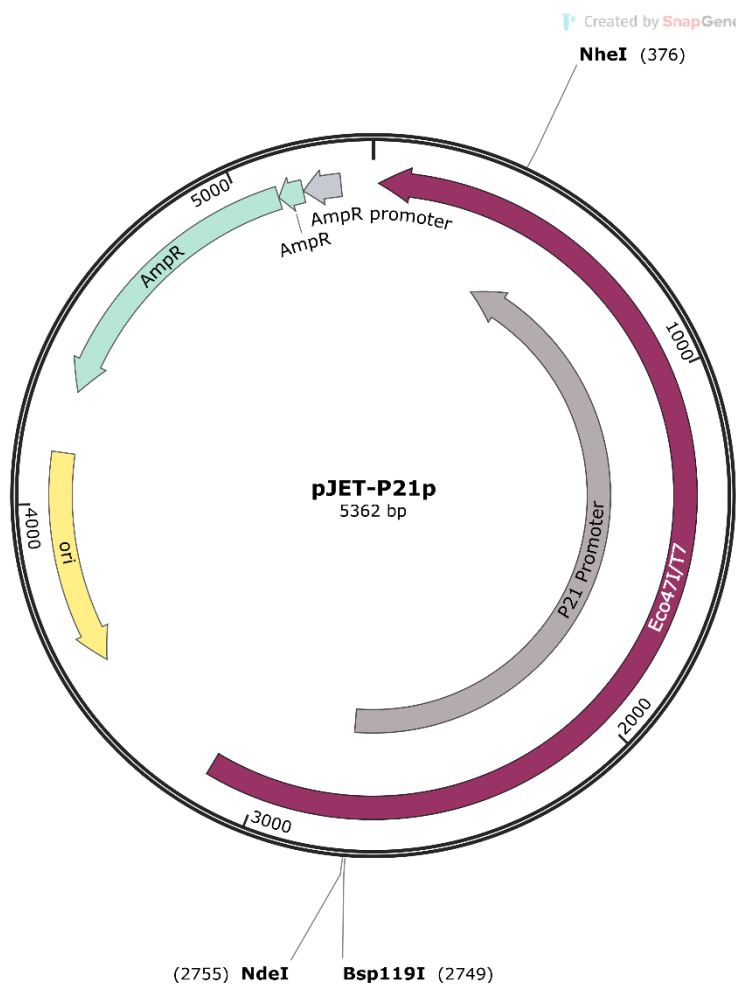
3.2. pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP reporterių konstravimas ir validavimas

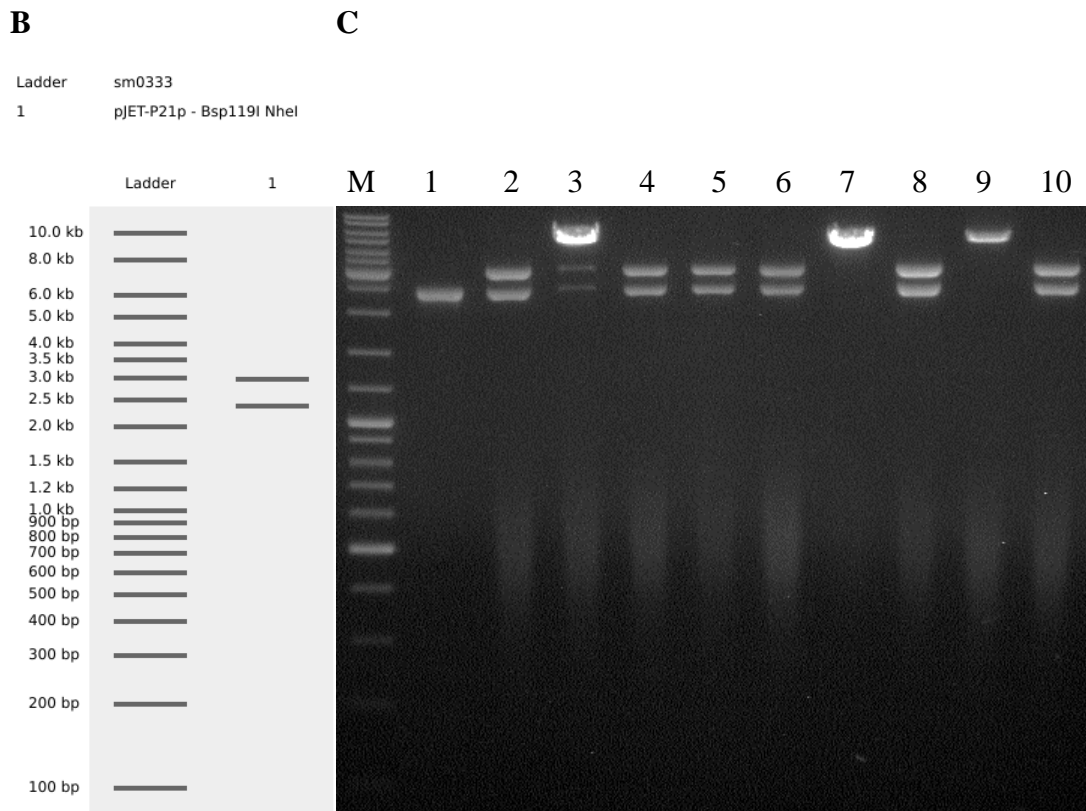
3.2.1. pJET-P21p konstravimas

pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP – esminiai konstruktai, kurie leidžia tiesiogiai stebėti P53 transkripcinį aktyvumą, matuojant eGFP signalą.

Visų pirma, P21p su dviem P53 atsako elementais buvo sėkmingai padaugintas PGR būdu. (5 pav.). Tačiau, kadangi P21p seka – pakankamai ilga (2,4 kb), buvo nuspręsta klonuoti ją į pJET plazmidę ir nusiųsti keletą klonų sekoskaitai. Konstruktas buvo pavadintas pJET-P21p (5 pav.).

A





3.2.1.1 pav. A – pJET-P21p konstrukto restrikcinis žemėlapis;

B – pJET-P21p konstrukto restrikcija su NheI ir Bsp119I endonukleazėmis *in silico*;

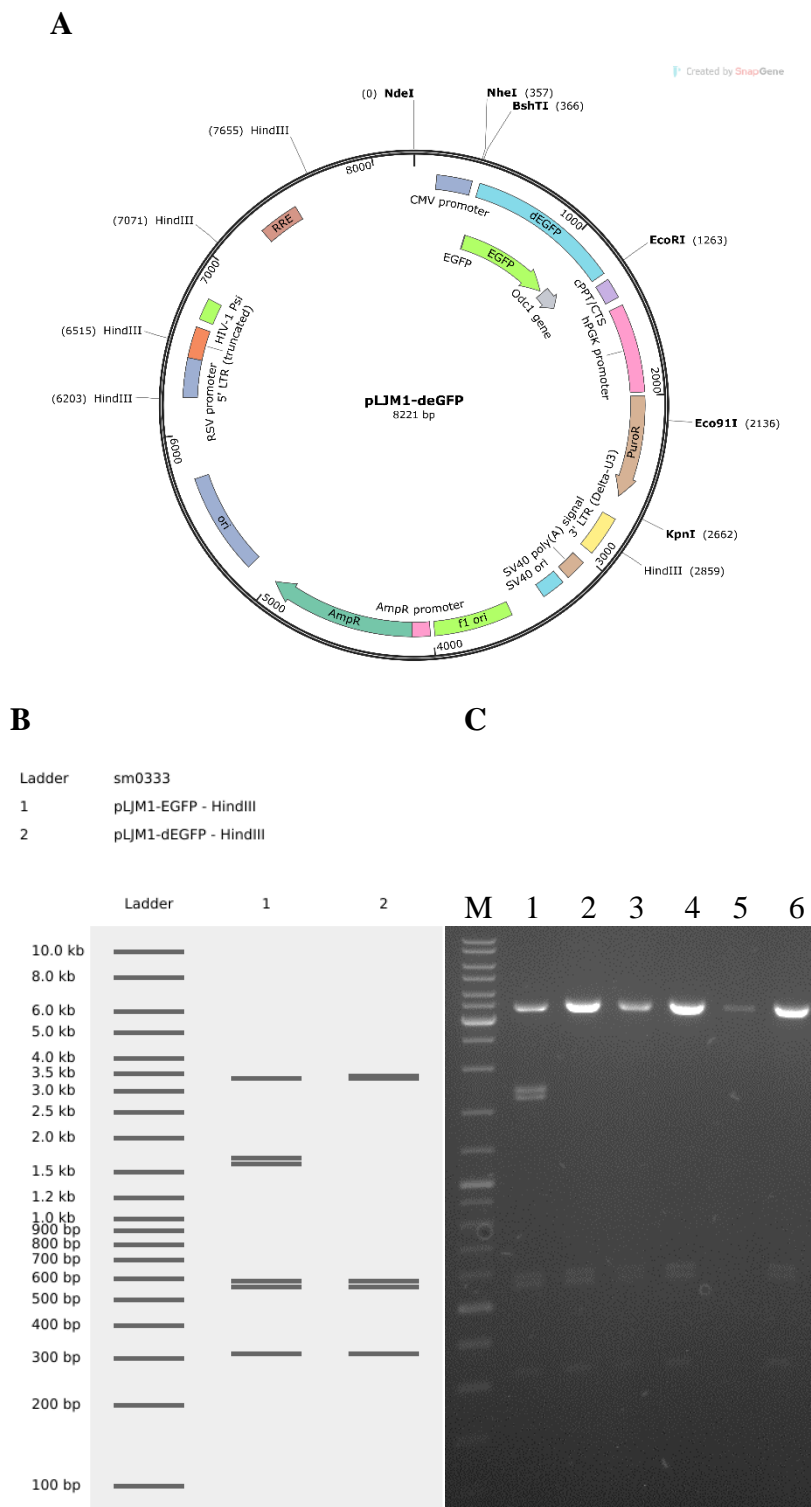
C – pJET-P21p konstrukto klonų restrikcinės analizės rezultatų vizualizavimas panaudojant DNR elektroforezę 1% agaroziniame gelyje

M – atitinka takelį su DNR markeriu SM0333; 1 – atitinka takelį su P21p PGR produktu; 2 – 10 atitinka takelius su pJET-P21 konstrukto skirtingais klonais (1-9).

Kaip matoma iš 3.2.1.1 pav., 1, 3, 4, 5, 7, 9 klonai iš 9 yra teigiami. 3 ir 4 buvo nusiųsti sekoskaitai ir 3 turėjo mažiausiai pavienių nukleotidų polimorfizmą (2) (jie neturi jokios įtakos P21 promotoriaus veiklumui). Jis ir buvo panaudotas tolimesniam konstravimui.

3.2.2. pLJM1-deGFP konstravimas

Tam, kad būtų sukonstruota pLJM1-P21p-deGFP plazmidė iš pradžių deGFP seka subklonuota iš pEGFP-C2-PEST vektoriaus į pLJM1-eGFP plazmidę, iškirpus paprastą eGFP. Gautas konstruktas buvo pavadintas pLJM1-deGFP (3.2.2.1a pav.).



3.2.2.1 pav. A – pLJM1-deGFP restrikinis žemėlapis;
B – pLJM1-eGFP bei pLJM1-deGFP konstruktų restrikinė analizė su HindIII *in silico*;
C – pLJM1-eGFP bei pLJM1-deGFP plazmidžių klonų restrikinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 1% agaroziniame gelyje
M – atitinka takelį su DNR markeriu sm0333; 1 takelis atitinka pLJM1-eGFP plazmidės restrikinės analizės rezultatus; 2-6 takeliai atitinka pLJM1-deGFP klonų (1-5) restrikinės analizės rezultatus.

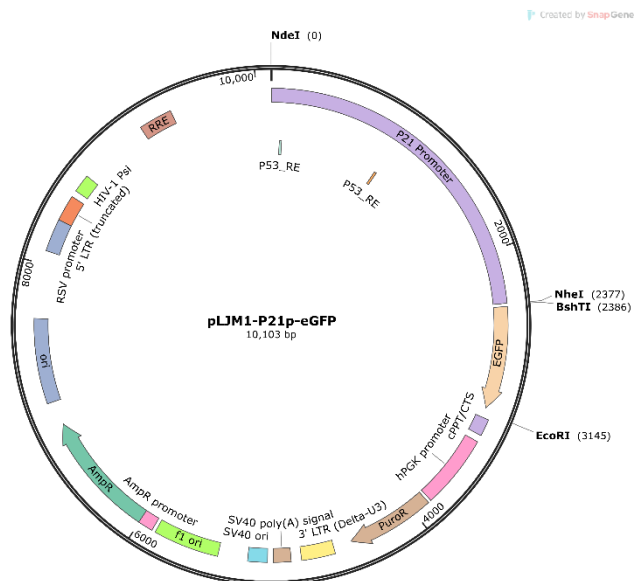
Kaip matoma iš 3.2.2.1 pav., 1, 2, 3, 5 klonai pLJM1-deGFP konstrukto yra teigiami. 1 buvo panaudotas tolimesniems konstravimams.

3.2.3. pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP konstravimas

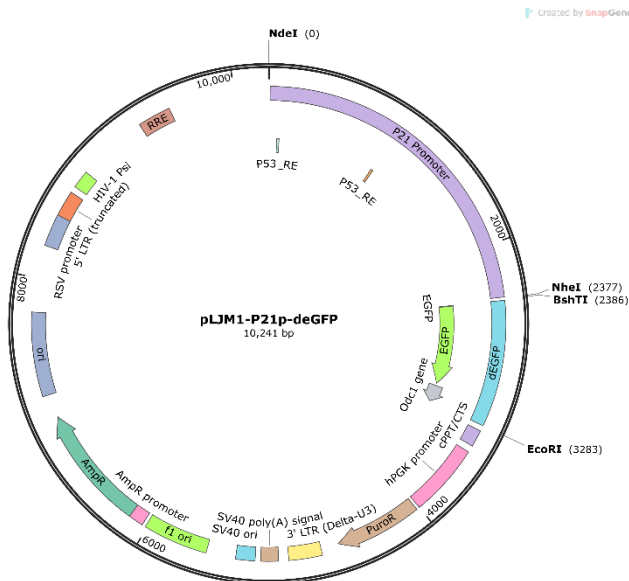
pLJM1-P21p-eGFP ir pLJM1-P21p-deGFP – svarbiausi ir galutiniai konstruktai, kuriuos įvedus į ląsteles būtų galima realiu laiku stebėti P53 transkripcijos aktyvumą.

Tam, kad atlikti paskutinį konstravimo žingsnį reikėjo subklonuoti P21 promotorių iš pJET-P21p konstrukto į pLJM1-eGFP bei pLJM1-deGFP plazmides. Gauti klonai buvo patikrinti naudojant restrikcinę analizę (3.2.3.1d pav.).

A



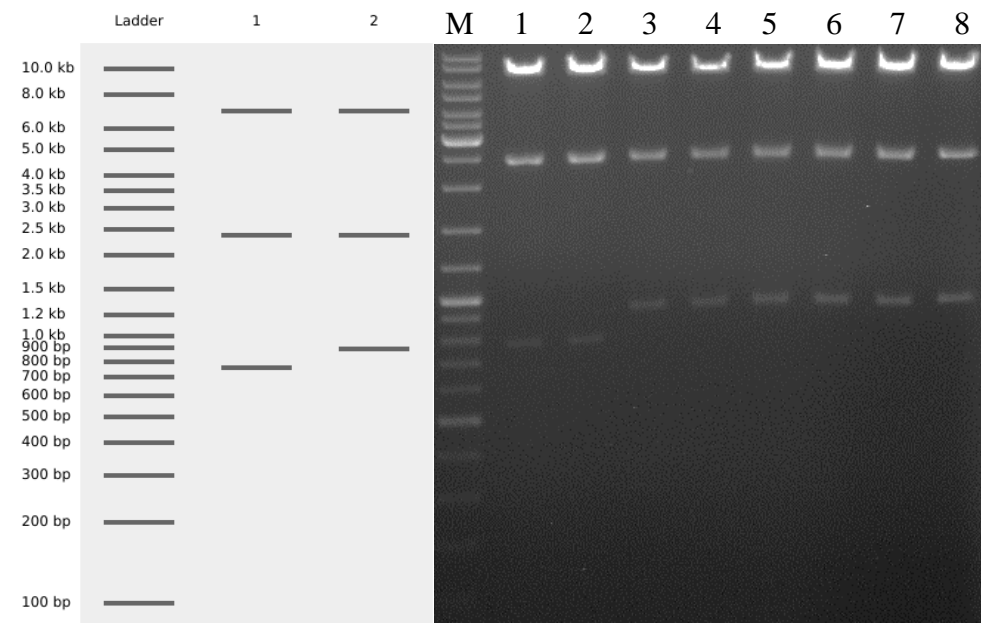
B



C

Ladder sm0333
 1 pLJM1-P21p-EGFP - BshTI EcoRI NdeI
 2 pLJM1-P21p-dEGFP - BshTI EcoRI NdeI

D



3.2.3.1 pav. A – pLJM1-P21p-eGFP restrikcinis žemėlapis;

B – pLJM1-P21p-deGFP restrikcinis žemėlapis;

C – pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP restrikcinė analizė su BshTI, EcoRI, NdeI *in silico*;

D – pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP plazmidžių klonų restrikcinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 1% agaroziniame gelyje

M – atitinka takelį su markeriu sm0333; 1, 2 takeliai atitinka pLJM1-P21p-eGFP dviejų klonų restrikcinės analizės rezultatus; 2-8 takeliai atitinka pLJM1-P21p-deGFP klonų restrikcinės analizės rezultatus.

Kaip matoma iš 3.2.3.1d pav., buvo gauti 2 teigiami klonai pLJM1-P21p-eGFP konstrukto bei 6 teigiami klonai pLJM1-P21p-deGFP konstrukto. Lentivirusinei transdukcijai buvo panaudoti pLJM1-P21p-eGFP 1 klonas ir pLJM1-P21p-deGFP 6 klonas.

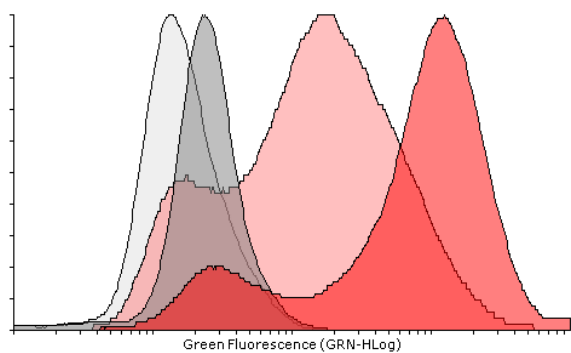
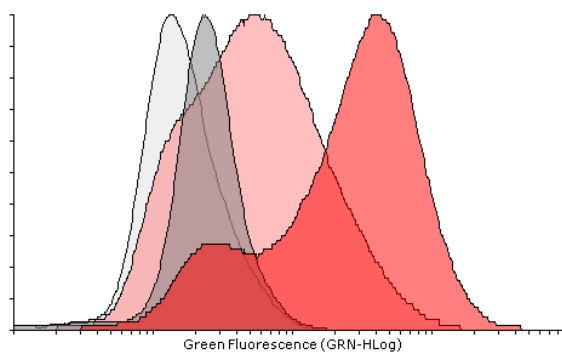
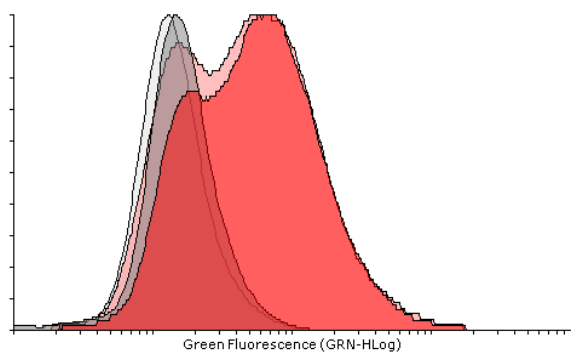
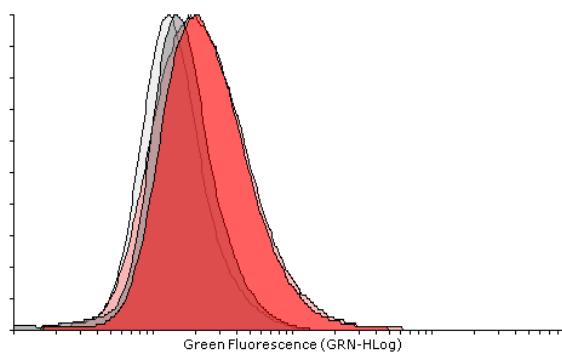
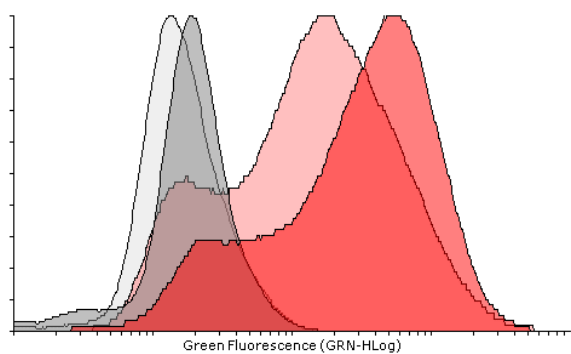
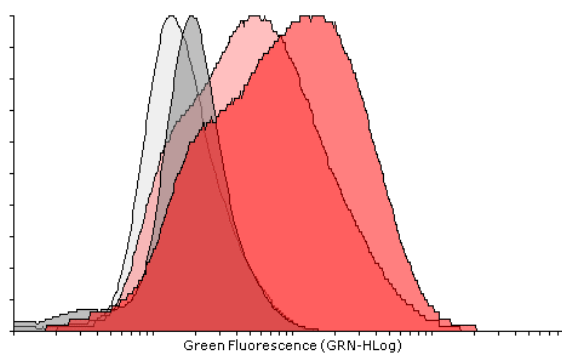
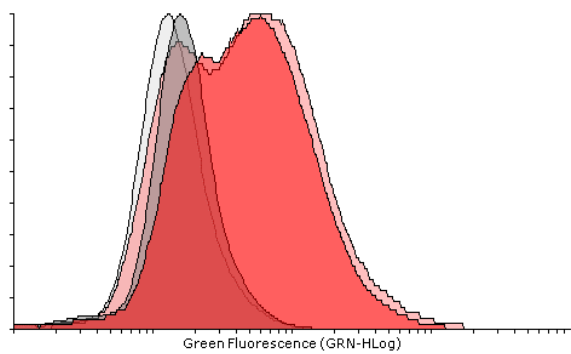
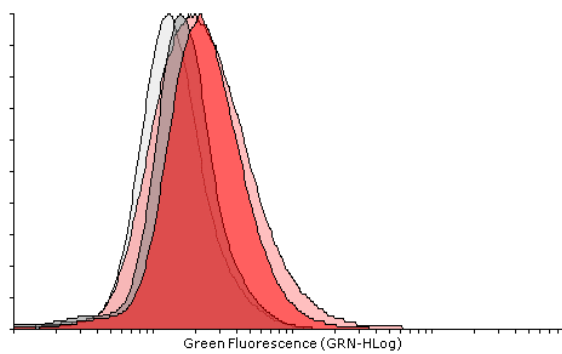
3.2.4. P21p-eGFP bei P21p-deGFP P53 reporterių validavimas

Galiausiai pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP konstruktai buvo gauti. Sekantis žingsnis buvo ląstelių transdukcija ir konstrukto validavimas.

Validavimui pasirinkta HCT116 ląstelių linija, kuri turi pakankamai aukštą natyvų P53 baltymo kiekį. Apie tą faktą minima literatūroje ir liudija eksperimentai, atlikti Proteomikos centro laboratorijoje (Kaeser et al., 2004). Sekanti priežastis, kodėl buvo pasirinktos šitos ląstelės, tai yra jų P53 genotipas: kaip parodė sekoskaita, atlikta Proteomikos centro laboratorijoje ir literatūra, P53 kodavimo sritis neturi jokių mutacijų (Abu El Maaty et al., 2017). Trečia pasirinkimo priežastis buvo ta, jog šitų ląstelių P53 „downstream“ nėra ypatingai sugadinta. Proteomikos Centro tyrimai parodė, jog P53 kiekis ląstelėse didėja po poveikių priešvėžiniais preparatais ir tuo metu aktyvuojama jo taikinių genų transkripcija, ypač *CDKN1A* (koduoja P21 baltymą) (Lees et al., 2020). Taip pat, Proteomikos centre, naudojant CRISPR/Cas9 technologiją, buvo išvesta HCT116 ląstelių linijos atmaina, kurioje *TP53* genas ir visos jo produkuojamos izoformos yra išveiklintos.

Taigi, buvo atlikta pLJM1-P21p-eGFP bei pLJM1-P21p-deGFP konstrukto lentivirusinė transdukcija ne tik į HCT-P ląsteles, bet ir į HCT-P-p53^{-/-}. HCT-P-P21p-eGFP, HCT-P-P21p-deGFP bei HCT-P-p53^{-/-}-P21p-eGFP, HCT-P-p53^{-/-}-P21p-deGFP ląstelių linijų žalios fluorescencijos intensyvumų palyginimas galėtų duoti atsakymą į klausimą, ar gauti reporteriai yra veiklūs, nes P53^{+/+} ląstelėse visada ekspresuojamas nedidelis transkriptiškai aktyvaus P53 kiekis. Tačiau, buvo nuspręsta atlikti poveikių preparatais, kurie pasak literatūros ir eksperimentų, atliktų Proteomikos centro laboratorijoje, žymiai padidina P53 kiekį (Lees et al., 2020). Tai oksaliplatina, priešvėžinis vaistas, naudojamas kolorektalinės karcinomos gydymui ir nutlin3a (nutlinas), specifinis MDM2 inhibitorius. Kadangi P53 kiekis ląstelėje yra reguliuojamas jo degradacijos greičio būdu, o degradacijai reikia, kad P53 ir MDM2 sąveikautų, nutlinas labai greitai ir efektyviai padidina P53 kiekį ląstelėse (Shen et al., 2008). Kita vertus, oksaliplatina pažeidžia DNR ir aktyvuoja P53 per atitinkamas kinazes (Pires et al., 2010).

Galų gale, buvo pasirinktos fiksuotos oksaliplatinos ir nutlino koncentracijos poveikiams (3.2.4.1 pav.). Be to, atlikti dozės-eGFP signalo stiprumo titravimai (3.2.4.2 pav.).

A**B****C****D****E****F****G****H**

Kontrolinė
ląstelių linija (su
tuščiu
vektoriumi)



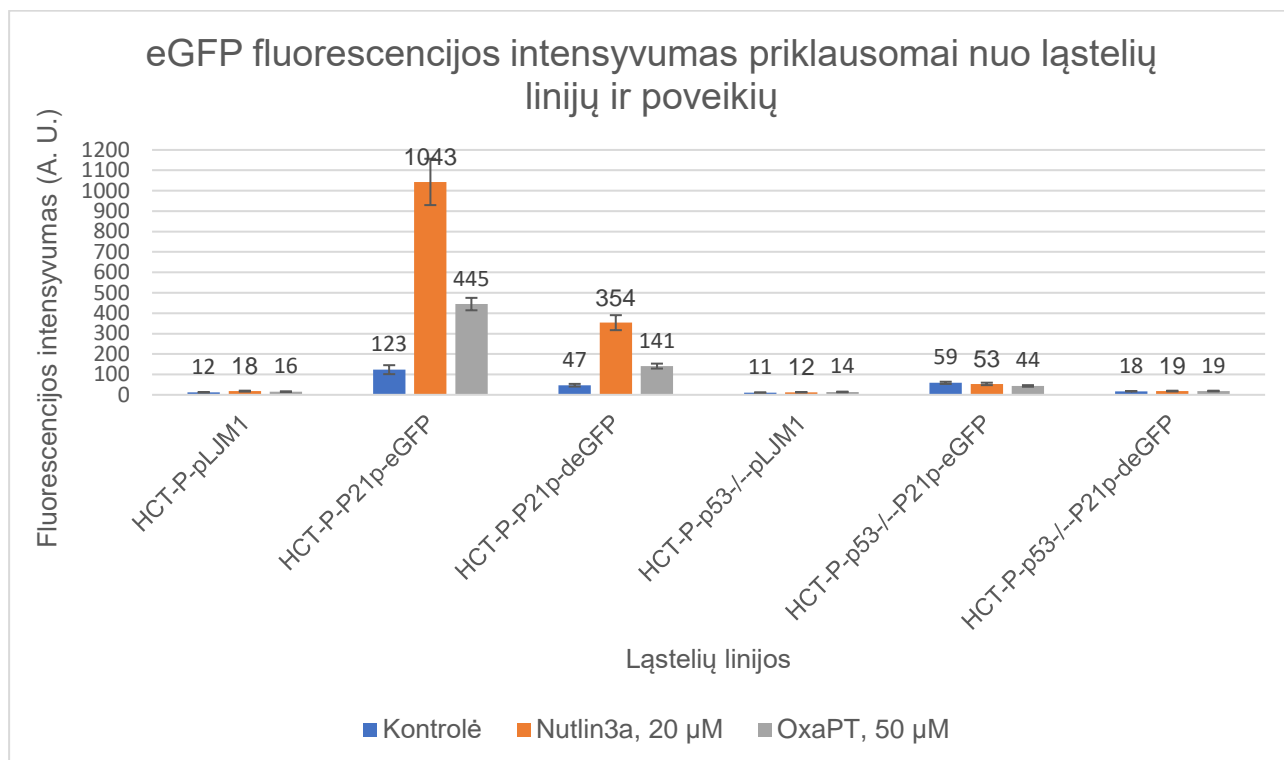
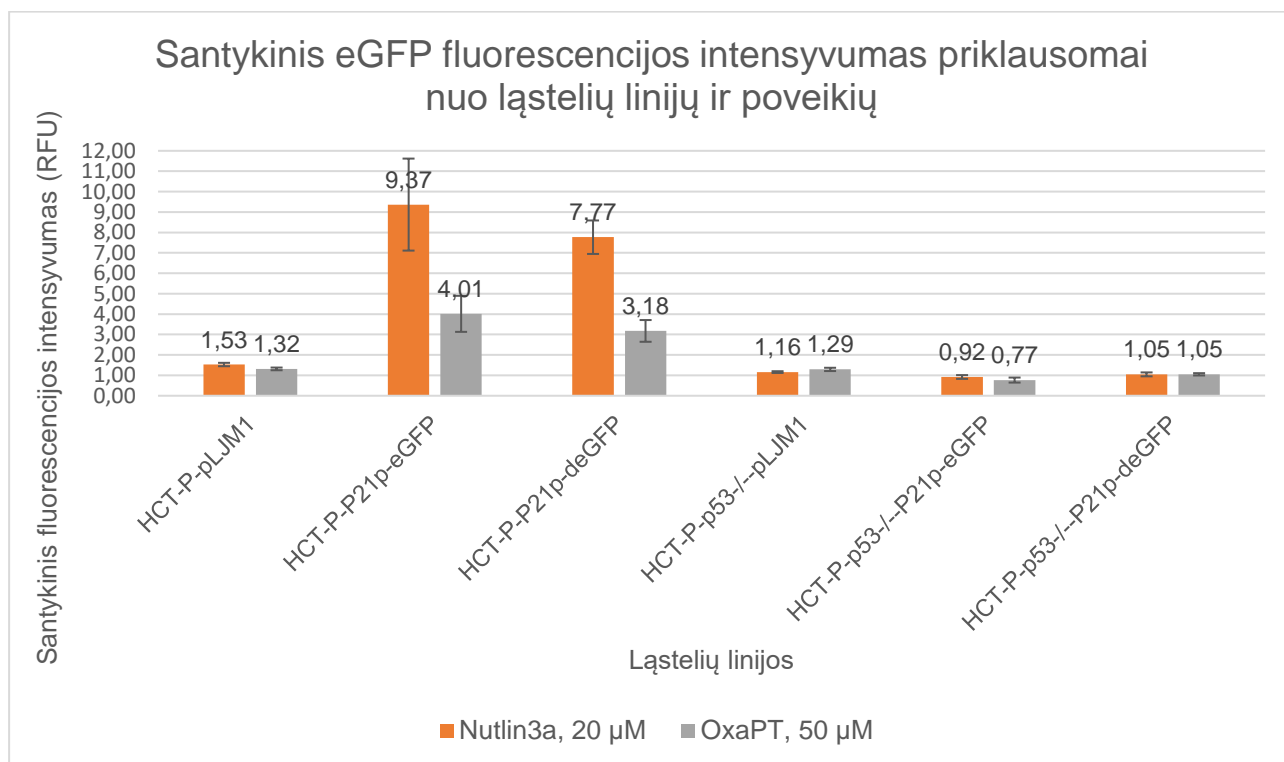
Kontrolinė
ląstelių linija (su
tuščiu
vektoriumi)
+
poveikis



Taikininė
ląstelių linija



Taikininė
ląstelių linija
+
poveikis

I**J**

3.2.4.1 pav. Žalios fluorescencijos signalo intensyvumas priklausomai nuo ląstelių linijų ir nutlino bei oksaliplatinos 24 val. poveikių:

A, B, C, D, E, G, H – reprezentatyvios tėkmės citometrijos duomenų histogramos:

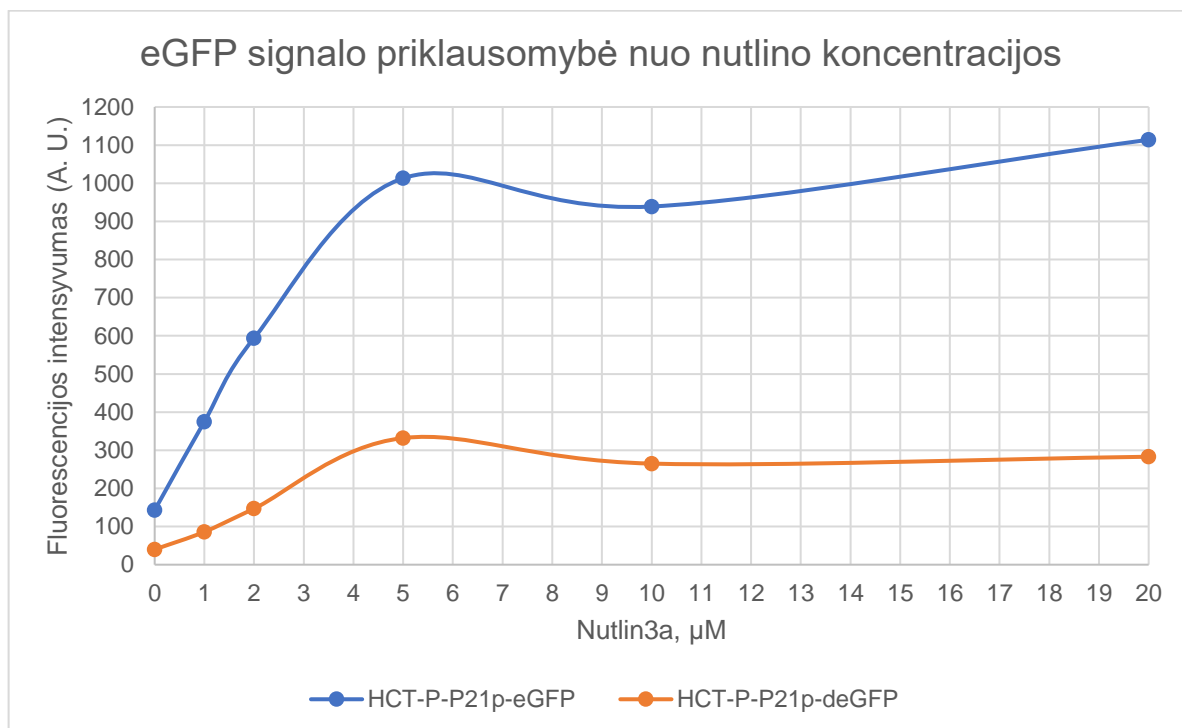
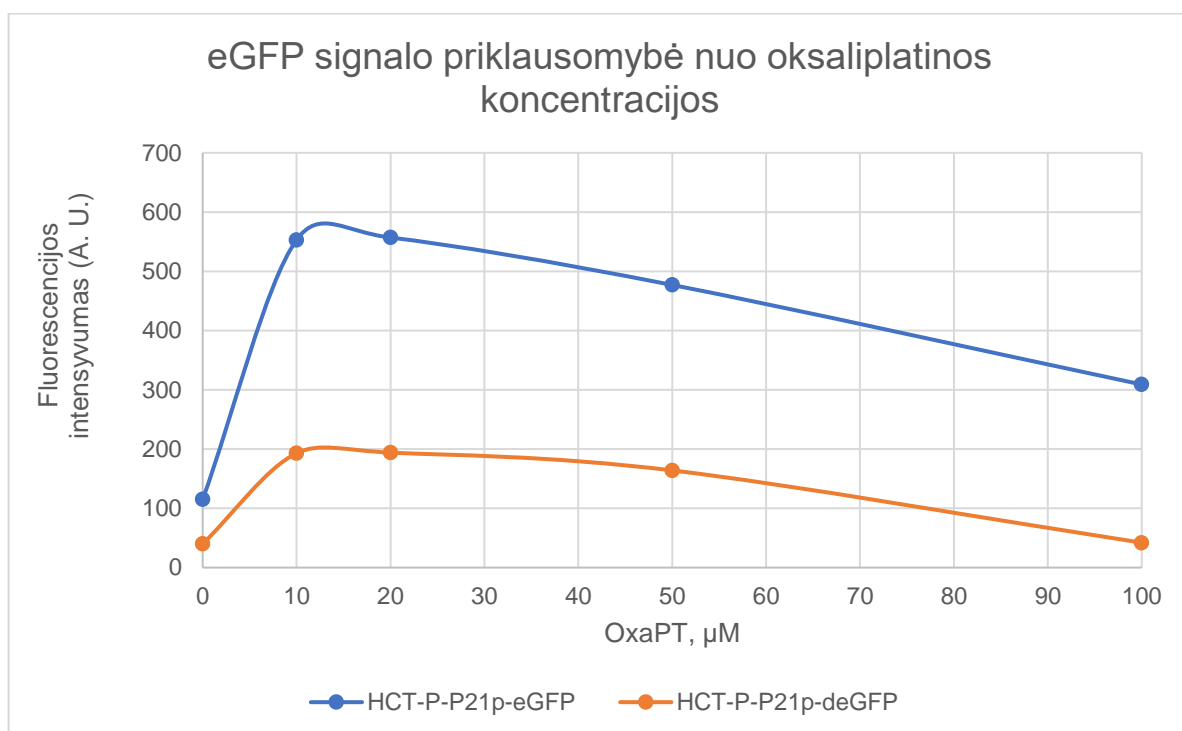
A – Kontrolinė linija – HCT-P-pLJM1, taikininė – HCT-P-P21p-eGFP, poveikis – 20 μM nutlino;

B – Kontrolinė linija – HCT-P-pLJM1, taikininė – HCT-P-P21p-deGFP, poveikis – 20 μM nutlino;

C – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-pLJM1, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-P21p-eGFP, poveikis - 20 μM nutlino;
D – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-pLJM1, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-P21p-deGFP, poveikis – 20 μM nutlino;
E – Kontrolinė linija – HCT-P-pLJM1, taikininė – HCT-P-P21p-eGFP, poveikis – 50 μM oksaliplatinos;
F – Kontrolinė linija – HCT-P-pLJM1, taikininė – HCT-P-P21p-deGFP, poveikis – 50 μM oksaliplatinos;
G – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-pLJM1, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-P21p-eGFP, poveikis – 50 μM oksaliplatinos;
H – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-pLJM1, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-P21p-deGFP, poveikis – 50 μM oksaliplatinos;
I – eGFP signalo intensyvumų bendras grafikas iš 4 biologinių pakartojimų;
Įverčiai atitinka aukščiausių histogramų taškų vidurkius.
J – santykinų eGFP signalo intensyvumų bendras grafikas iš 4 biologinių pakartojimų
Šiuo atveju reikšmės po poveikių buvo padalintos iš reikšmių be poveikių.

Kaip matoma iš 3.2.4.1 pav., P53 statusas dramatiškai veikia į eGFP bei deGFP reporterių signalų intensyvumus, nepriklausomai nuo poveikių. Taip pat, poveikiai su nutlino ir oksaliplatinos dramatiškai padidina eGFP signalo intensyvumą P53^{+/+} ląstelėse, P53^{-/-} ląstelėse signalas beveik nesikeičia. Tačiau, nutlino sukelia žalio signalo intensyvumo žymiai didesnę pokytį, negu oksaliplatinos. Galima pastebėti, jog deGFP signalo intensyvumas nepriklausomai nuo poveikių ir P53 statuso yra mažesnis negu eGFP. Lyginant eGFP bei deGFP signalų intensyvumus P53^{+/+} ląstelių linijose, santykinai signalas padidėja daugiau eGFP ląstelių linijoje. Galima pastebėti, jog dalis ląstelių neatsako į P53 stimuliaciją, o po poveikių jų dalis mažėja, bet nedingsta.

Sekantis žingsnis buvo nustatyti ar yra priklausomybė tarp didėjančių P53 induktorių koncentracijų ir žalios fluorescencijos signalo intensyvumo. Norint pasiekti šitą tikslą, HCT-P-P21p-eGFP bei HCT-P-P21p-deGFP ląstelių linijos buvo veikiamos skirtingomis P53 induktorių koncentracijomis (3.2.4.2 pav.).

A**B****C**

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,801693929
R Square	0,642713156
Adjusted R Square	-1,5
Standard Error	259,4326094
Observations	1

D

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,679269543
R Square	0,461407113
Adjusted R Square	-1,5
Standard Error	96,78908819
Observations	1

3.2.4.2 pav. eGFP ir deGFP signalų intensyvumų priklausomybė nuo P53 induktorių koncentracijos:

A – eGFP ir deGFP signalų priklausomybė nuo nutlino koncentracijos;

B – eGFP ir deGFP signalų priklausomybė nuo oksaliplatinos koncentracijos;

C – eGFP signalo priklausomybės nuo nutlino koncentracijos regresinės analizės rodikliai;

D – deGFP signalo priklausomybės nuo nutlino koncentracijos regresinės analizės rodikliai.

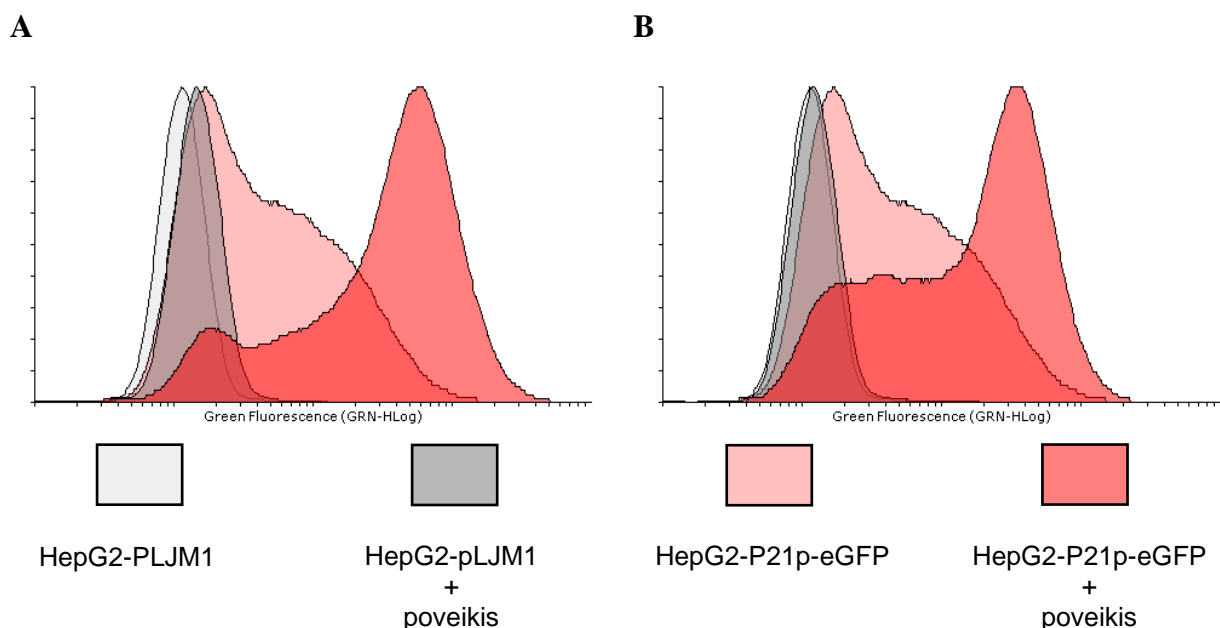
Kaip galima pastebėti iš 3.2.4.2 pav., nutlino atveju eGFP ir deGFP signalai didėja nuo 1 μM iki 5 μM koncentracijos. Po 5 μM koncentracijos pasiekiamas plato. Oksaliplatinos atveju, akivaizdu, jog buvo parinktos netinkamos koncentracijos titravimui ir po 10 μM eGFP bei deGFP intensyvumai mažėja. Sulyginus eGFP ir deGFP priklausomybių nuo nutlino koncentracijos regresinės analizės rodiklius, galima teigti, jog eGFP priklausomybė nuo nutlino koncentracijos yra stipresnė.

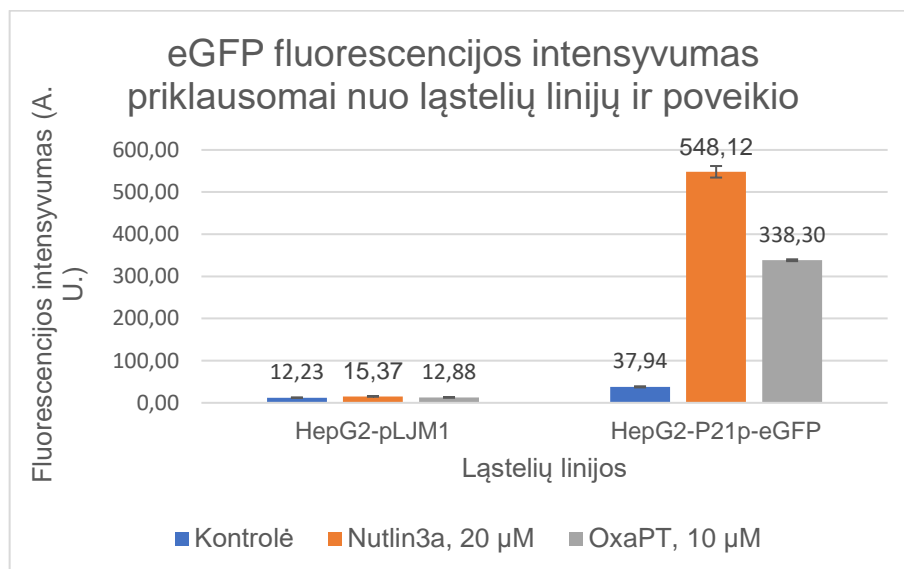
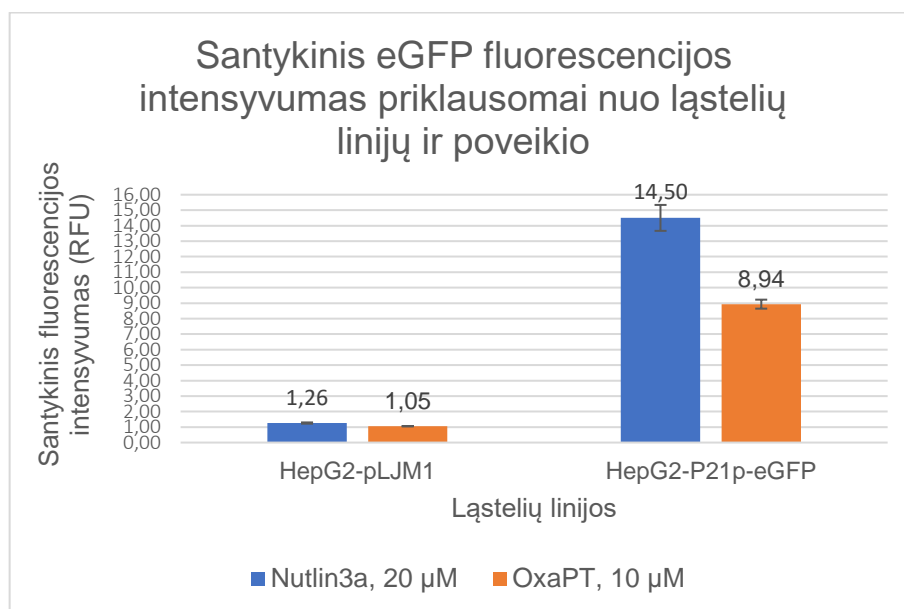
3.3 Fluorescencinio P53 reporterio pritaikymas

3.3.1. HepG2 ląstelių linijos P53 transkripcinio aktyvumo nustatymas

HepG2 linijos P53 statusas Proteomikos centre iki šiol nėra tiksliai žinomas. Visi bandymai aptikti P53 naudojant imunoblotą buvo nesėkmingi (buvo naudojami skirtingi tiek antriniai, tiek pirminiai antikūnai). Tačiau, iš literatūros žinoma, jog šitos linijos P53 statusas yra teigiamas. Maža to, šita linija neturi *TP53* geno mutacijų. Tačiau, P53 ekspresija dažniausiai aprašoma kaip vidutinio lygio (Lee & Park, 2015). Tuomet, buvo nuspręsta patikrinti šitos linijos P53 transkripcinį aktyvumą panaudojus P21p-eGFP P53 reporterį.

Taigi, pLJM1-empty bei pLJM1-P21p-eGFP plazmidės buvo sėkmingai transdukuotos į HepG2 ląsteles. Iš pradžių buvo nuspręsta patikrinti eGFP signalo intensyvumą veikiant fiksuotomis nutlino ir oksaliplatinos koncentracijomis (3.3.1.1 pav.)



C**D**

3.3.1.1 pav. eGFP signalo intensyvumas priklausomai nuo ląstelių linijų ir nutlino bei oksaliplatinos 24 val. poveikių:

A, B – reprezentatyvios tėkmės citometrijos duomenų histogramos:

A – Poveikis – 20 μM nutlino;

B – Poveikis – 10 μM oksaliplatinos;

C – eGFP signalo intensyvumų bendras grafikas iš 3 biologinių pakartojimų;

Įverčiai atitinka aukščiausių histogramų taškų vidurkius.

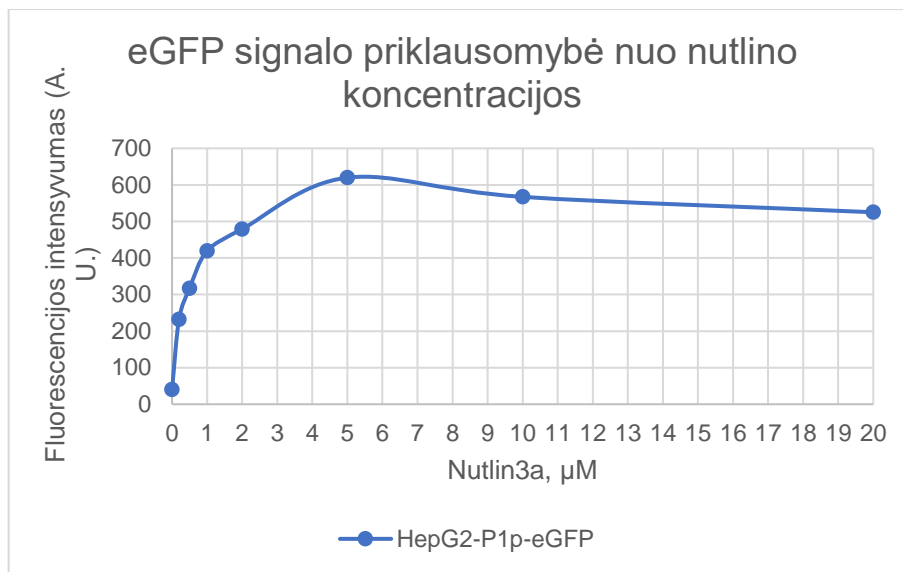
D – santykinų eGFP signalo intensyvumų bendras grafikas iš 3 biologinių pakartojimų

Šiuo atveju reikšmės po poveikių buvo padalintos iš reikšmių be poveikių.

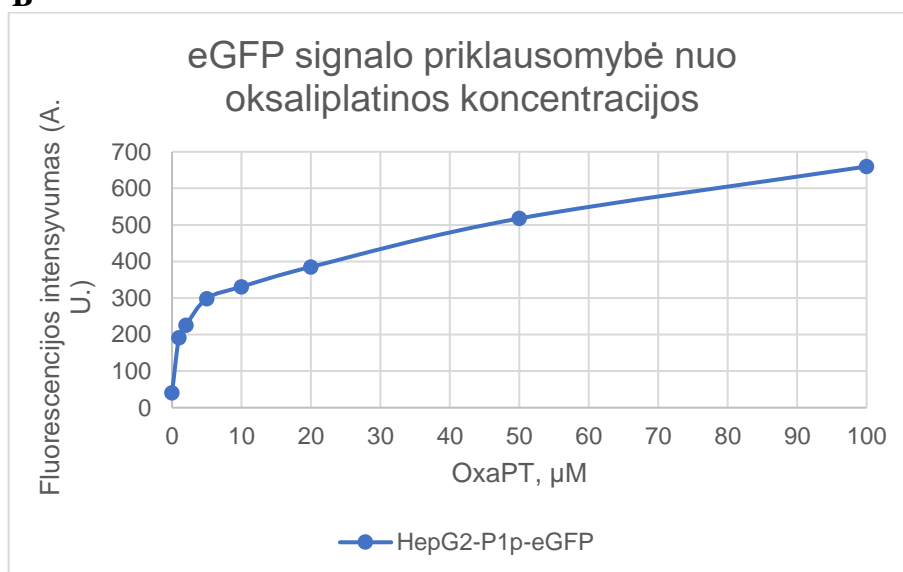
Kaip matoma iš 3.3.1.1 pav., eGFP signalo intensyvumas dramatiškai didėja paveikus ląsteles nutlinu arba oksaliplatinu, kadangi kontrolinės linijos signalas nesikeičia. Įdomu tai, jog vertinant santykinį eGFP signalo pokytį veikiant nutlinu galima pastebėti, jog jis net didesnis negu HCT116

ląstelių linijoje (3.2.4.1j pav.). Toliau buvo atliktas nutlino ir oksaliplatinos koncentracijų titravimas (3.3.1.2 pav.).

A



B



C

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,565948
R Square	0,320297
Adjusted R Square	-1,33333
Standard Error	172,535
Observations	1

D

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,900131
R Square	0,810235
Adjusted R Square	-1,33333
Standard Error	90,99358
Observations	1

3.3.1.2 pav. eGFP signalo intensyvumo priklausomybė nuo P53 induktorių koncentracijos:

A – eGFP signalo priklausomybė nuo nutlino koncentracijos;

B – eGFP signalo priklausomybė nuo oksaliplatinos koncentracijos;

C – eGFP signalo priklausomybės nuo nutlino koncentracijos regresinės analizės rodikliai;

D – eGFP signalo priklausomybės nuo oksaliplatinos koncentracijos regresinės analizės rodikliai.

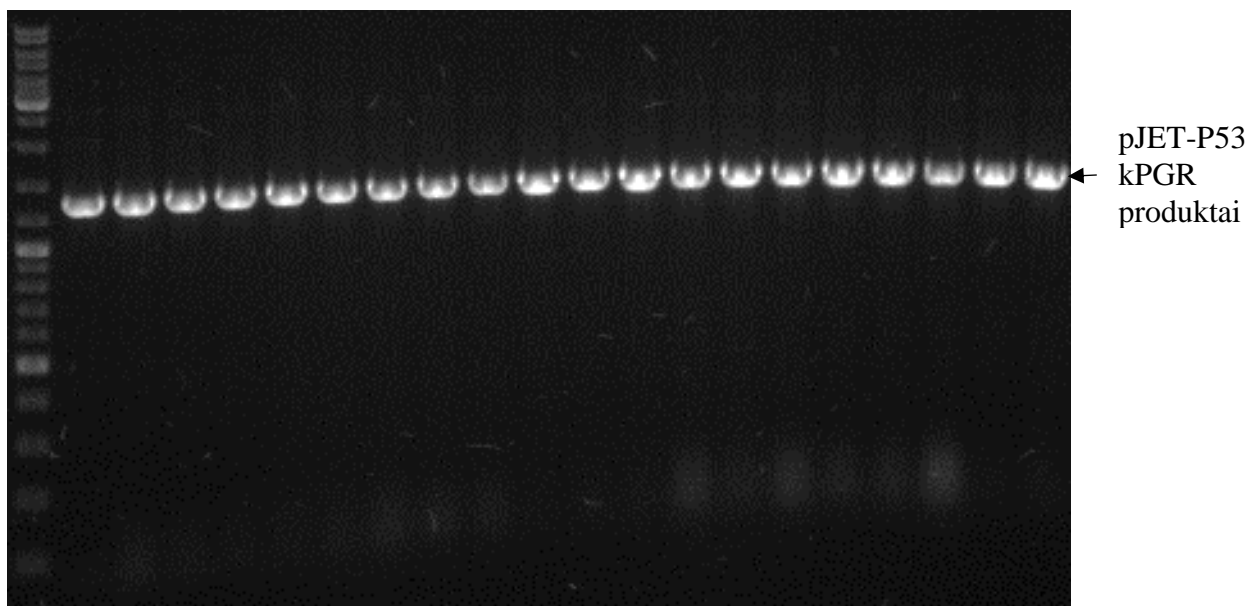
Kaip galima pastebėti iš 3.3.1.2 pav., eGFP signalas didėja priklausomai nuo oksaliplatinos ir nutlino koncentracijų. Tačiau, nutlino atveju po 5 μM koncentracijos žalio signalo intensyvumas pradeda mažėti. Tai siejasi su nutlino titravimo rezultatais, gautais tiriant HCT116 ląstelių liniją. Kita vertus, oksaliplatinos atveju eGFP signalas didėja iki 100 μM koncentracijos, nors HCT116 ląstelių linijoje pradeda mažėti jau po 10 μM arba net anksčiau (3.2.4.2b pav.).

3.3.2. PC1 ir PC2 ląstelių linijų TP53 genotipavimas bei transkripcinio aktyvumo nustatymas

Vykdamas „Kasos vėžio individualizuotas gydymas: inovatyvus, proteomine analize pagrįsto, vaistų parinkimo metodo sukūrimas“ projektą Proteomikos centre buvo išvestos PC1 ir PC2 ląstelių linijos. Kadangi, vienas iš projekto uždavinių buvo genotipuoti genas, susijusius su vėžiu, buvo atliktas ir TP53 genotipavimas.

Kad būtų atliktas genotipavimas, buvo klonuota P53 koduojanti sritis į pJET plazmidę, panaudojus PGR iš PC1 ir PC2 linijų kDNR, po to atlikta pJET-P53 plazmidžių sekoskaita. P53 padauginimas sėkmingai atliktas panaudojant PGR, o P53 sekos įvedimas į pJET plazmidę buvo atliktas naudojant *Clonejet PCR Cloning Kit* rinkinio protokolą. Teigiami transformantai buvo atrinkti panaudojus kolonijų PGR (3.3.2.1 pav.).

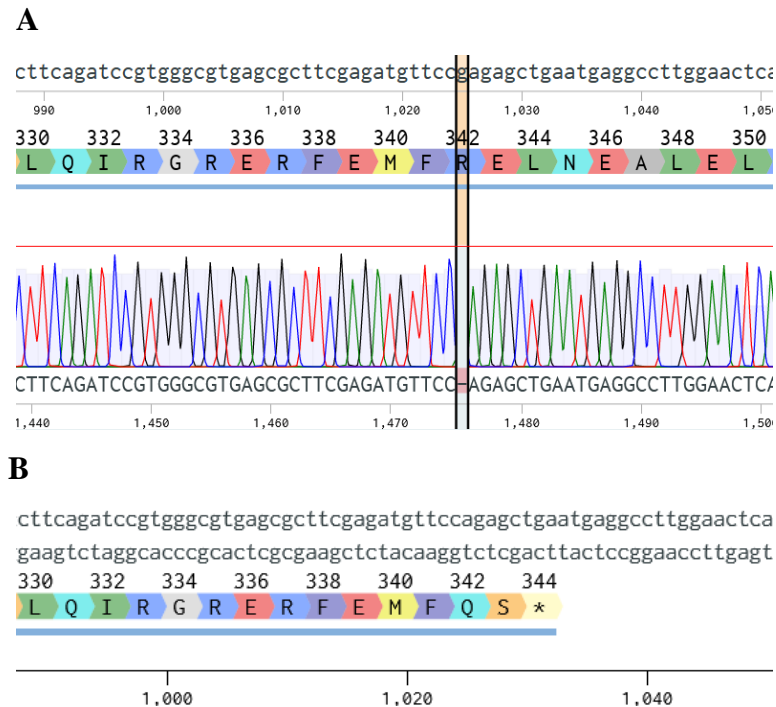
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



3.3.2.1 pav. pJET-P53 konstrukto kolonijų PGR rezultatų vizualizavimas naudojant DNR elektroforezę 1% agaroziniame gelyje

M – atitinka takelį su SM0333 DNR markeriu, 1-10 atitinka takelius su PC1 ląstelių linijos pJET-P53 1-10 transformantais, 11-20 atitinka takelius su PC2 ląstelių linijos pJET-P53 1-10 transformantais.

Kaip galima pastebėti iš 3.3.2.1 pav., buvo gauta 10 teigiamų klonų pJET-P53 konstrukto su P53 sekomis iš PC1 ir tiek pat su P53 sekomis iš PC2 linijų. Sekoskaitai buvo nusiųsta po 3 klonus iš kiekvienos linijos. Sekoskaitos rezultatai parodė vienodos homozigotinės mutacijos, kurios nėra duomenų bazėse, egzistavimą PC1 ir PC2 ląstelių linijose (nors linijos buvo išvestos iš skirtingų pacientų kasos navikų) (3.3.2.2 pav.).



3.3.2.2 pav. Aptikta *TP53* mutacija PC1 ir PC2 ląstelių linijose

A – Sekoskaitos rezultatų sulginimas su koduojančiu *TP53* regionu su skaitymo rėmelio aminorūgščių indeksais

Viršutinių skaičių eilė reprezentuoja nukleotidų numerius nuo skaitymo rėmelio pradžios.

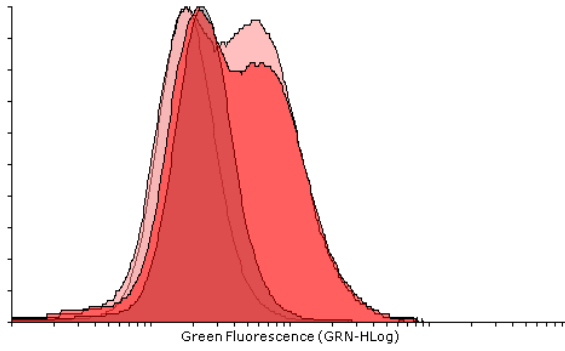
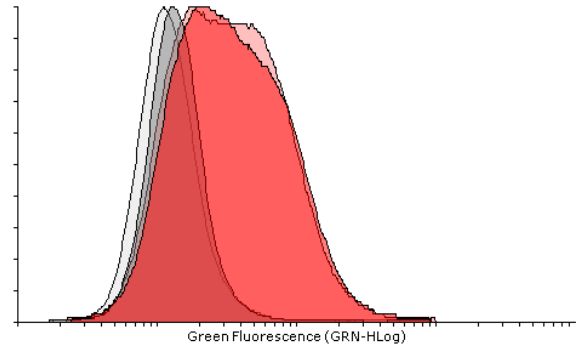
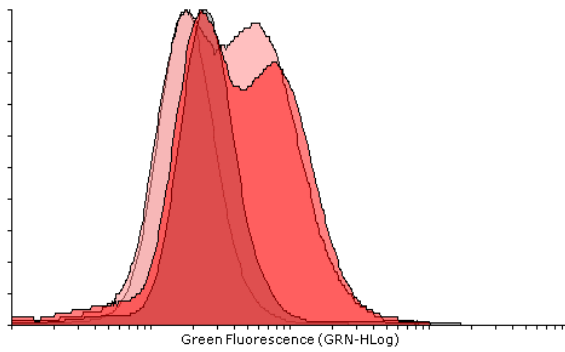
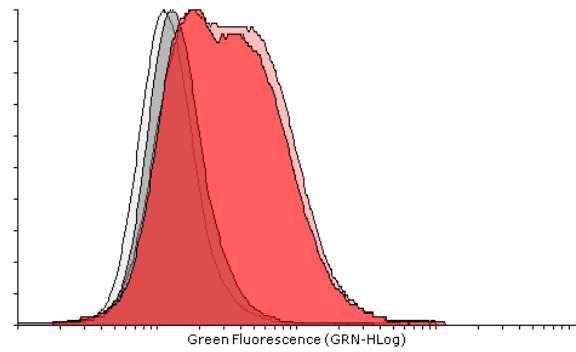
B – Mutacijos pasekmės *TP53* geno skaitymo rėmeliui

Apatinių skaičių eilė rodo P53 nukleotidų numerius nuo skaitymo rėmelio pradžios.

Kaip matoma iš 3.3.2.2a pav., mutacijos nomenklatūrinis pavadinimas yra NM_000546(*TP53*): c.1025delG (p.Arg342Glnfs*3). Tačiau, kadangi šitos mutacijos nėra duomenų bazėse, jos įtaka P53 transkripciniam aktyvumui nebuvo įvertinta.

Prieš įvedant pLJM1-emytį bei pLJM1-P21p-eGFP konstruktus, PC1 ir PC2 ląstelių linijų *TP53* geno ekspresija buvo patikrinta naudojant imunoblotą (rezultatai parodė P53 kiekį, palyginamą su P53 kiekiu HCT116 ląstelėse, be to buvo aptiktas specifinis poslinkis, kuris galimai atsirado dėl P53 C-galo dalies praradimo) (duomenys nėra parodyti).

Taigi, pLJM1-emytį bei pLJM1-P21p-eGFP plazmidės buvo sėkmingai transdukuotos į PC1 bei PC2 ląstelių linijas. Po to buvo atlikti poveikiai standartiniais P53 induktoriais, bei įvertintas eGFP signalo intensyvumas (3.3.2.3 pav.).

A**B****C****D**

Kontrolinė
ląstelių linija (su
tuščiu
vektoriumi)



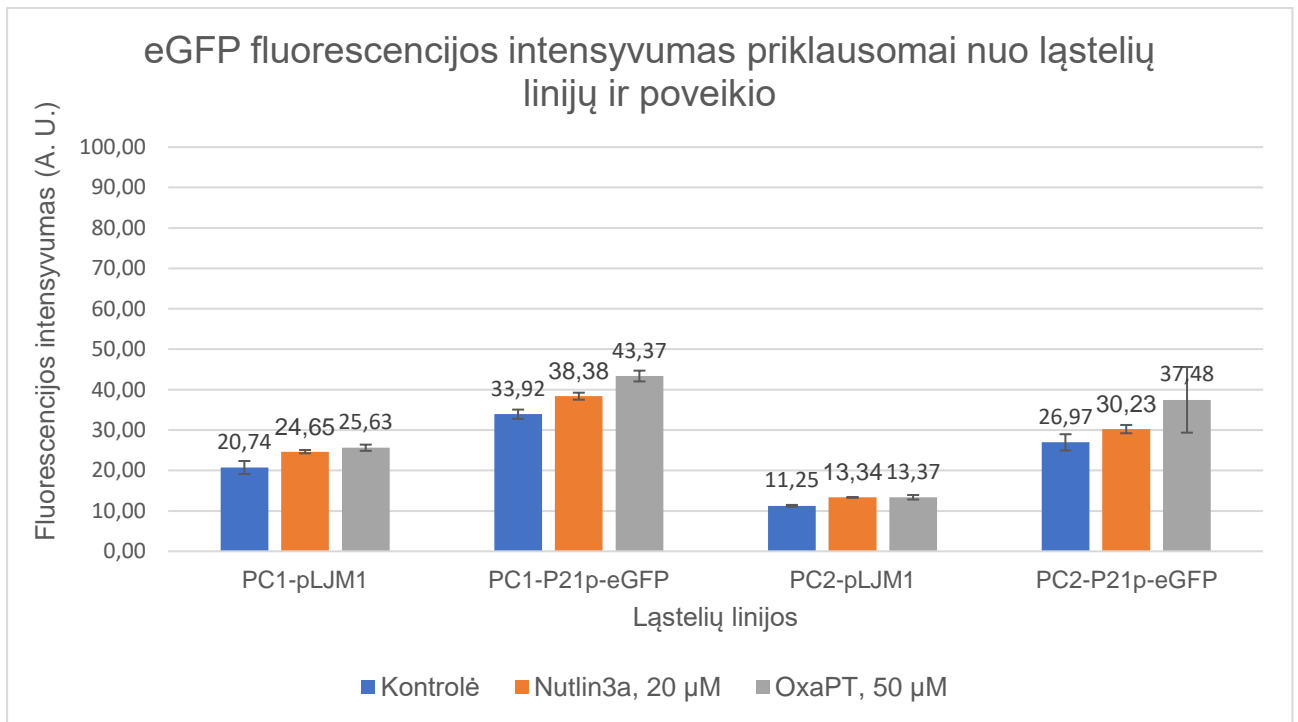
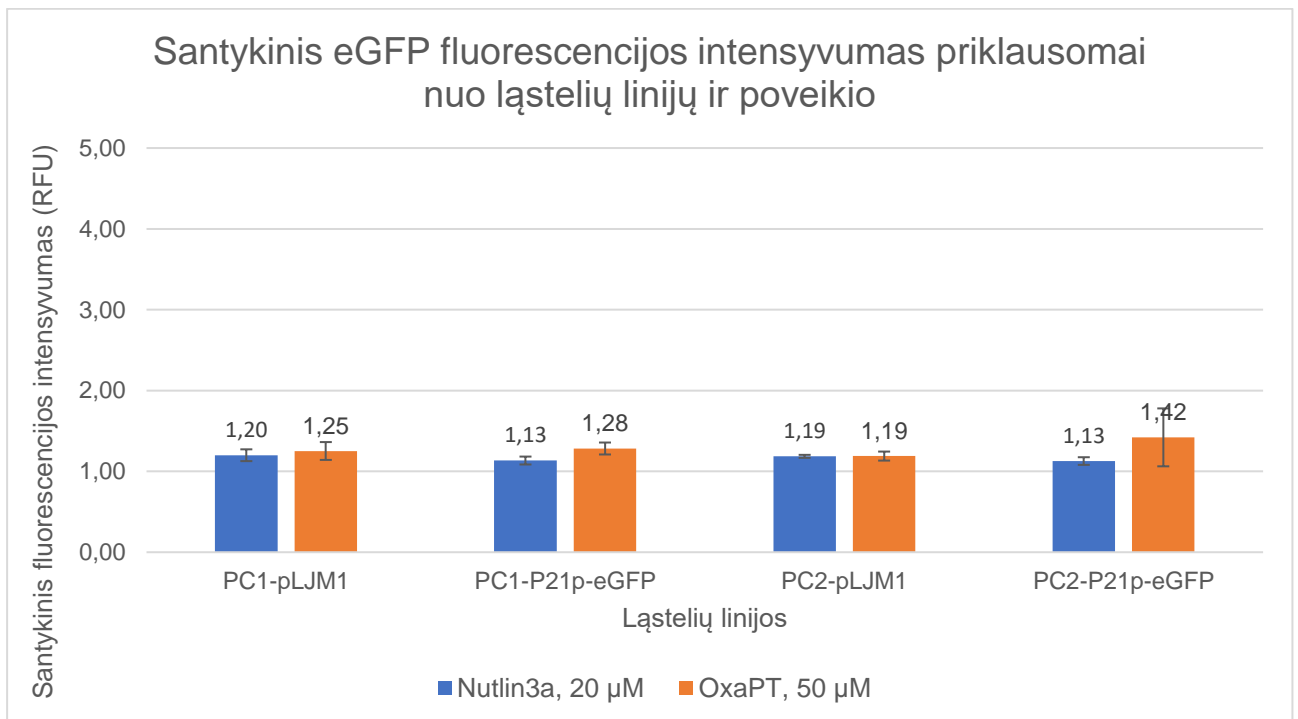
Kontrolinė
ląstelių linija (su
tuščiu
vektoriumi)
+
poveikis



Taikininė
ląstelių linija



Taikininė
ląstelių linija
+
poveikis

E**F**

3.3.2.3 pav. eGFP signalo intensyvumas priklausomai nuo ląstelių linijų ir 20 μM nutlino bei 50 μM oksaliplatinos 24 val. poveikių:

A, B, C, D – reprezentatyvios tėkmės citometrijos duomenų histogramos:

A – Kontrolinė linija – PC1-pLJM1, taikininė – PC1-P21p-eGFP,

poveikis – 20 μM nutlino;

B – Kontrolinė linija – PC2-pLJM1, taikininė – PC2-P21p-deGFP,

poveikis – 20 μM nutlino;

C – Kontrolinė linija – PC1-pLJM1, taikininė – PC1-P21p-eGFP,

poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

D – Kontrolinė linija – PC2-pLJM1, taikininė – PC2-P21p-deGFP,

poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

E – eGFP signalo intensyvumų bendras grafikas iš 3 biologinių pakartojimų;

Įverčiai atitinka histogramų medianas.

D – santykinų eGFP signalo intensyvumų bendras grafikas iš 3 biologinių pakartojimų

Šiuo atveju reikšmės po poveikių buvo padalintos iš reikšmių be poveikių.

Kaip matoma iš 3.3.2.3 pav., nei poveikis nutlinu, nei poveikis oksaliplatina nesukelia patikimo eGFP signalo intensyvumo padidėjimo. Tačiau, iš tėkmės citometrijos duomenų FCS/SSC pasiskirstymai skiriasi tarp ląstelių be ir su poveikiais (duomenys neparodyti). Tai reiškia, jog morfologija pasikeitė.

3.4. P53 fluorescencinio reporterio modifikavimas

Kadangi praeitose reporterio versijose buvo panaudotas P21 promotoriaus 2,4 kb gabalas, faktas, jog toje sekoje egzistuoja kitų transkripcinių faktorių atpažinimo motyvai. Pavyzdžiui, AP-1 (Chung et al., 2002). Atviras klausimas ar jie realiai veikia reporterio specifiškumą P53. Tačiau tam, kad būtų užtikrinta, jog P53 reporteris yra tikrai specifinis P53, buvo panaudota kita prieiga prie jo naujos versijos kūrimo.

Žinoma, jog standartiniai reporteriai yra kuriami pagal tokį principą:

1. Transkripcijos faktorių motyvų atpažinimo deriniai (skirtingas skaičius atsako elementų, skirtingi tarpai tarp jų) klonuojami į atitinkamą vektorių;
2. Skirtingi minimalūs (šerdiniai) promotoriai klonuojami skirtingais atstumais nuo atsako elementų (promotorius turi būti iš 3' galo nuo atsako elementų);
3. Fluorescencinių baltymų arba liuciferazės genai klonuojami iš 3' galo nuo minimalių promotorių;
4. Sistemos testuojamos ląstelėse su taikininio transkripcijos faktoriaus induktoriais arba tiesiogiai manipuluojant jo ekspresija.

Sekti tą patį principą buvo nuspręsta ir P53 atveju. Buvo parinkti du P53 atsako elementų deriniai:

- a) P21 promotoriaus 5' atpažinimo elementas – stipriausias elementas gamtoje (Jordan et al. 2012);
- b) Trys P53 atsako elementai be tarpų tarp jų: ConA (stipriausias sintetinis P53 atsako elementas), P21 5' atpažinimo elementas, atpažinimo elementas iš BCLB6 geno promotoriaus (Jordan et al., 2012).

Taip pat buvo pasirinkti du minimalūs promotoriai:

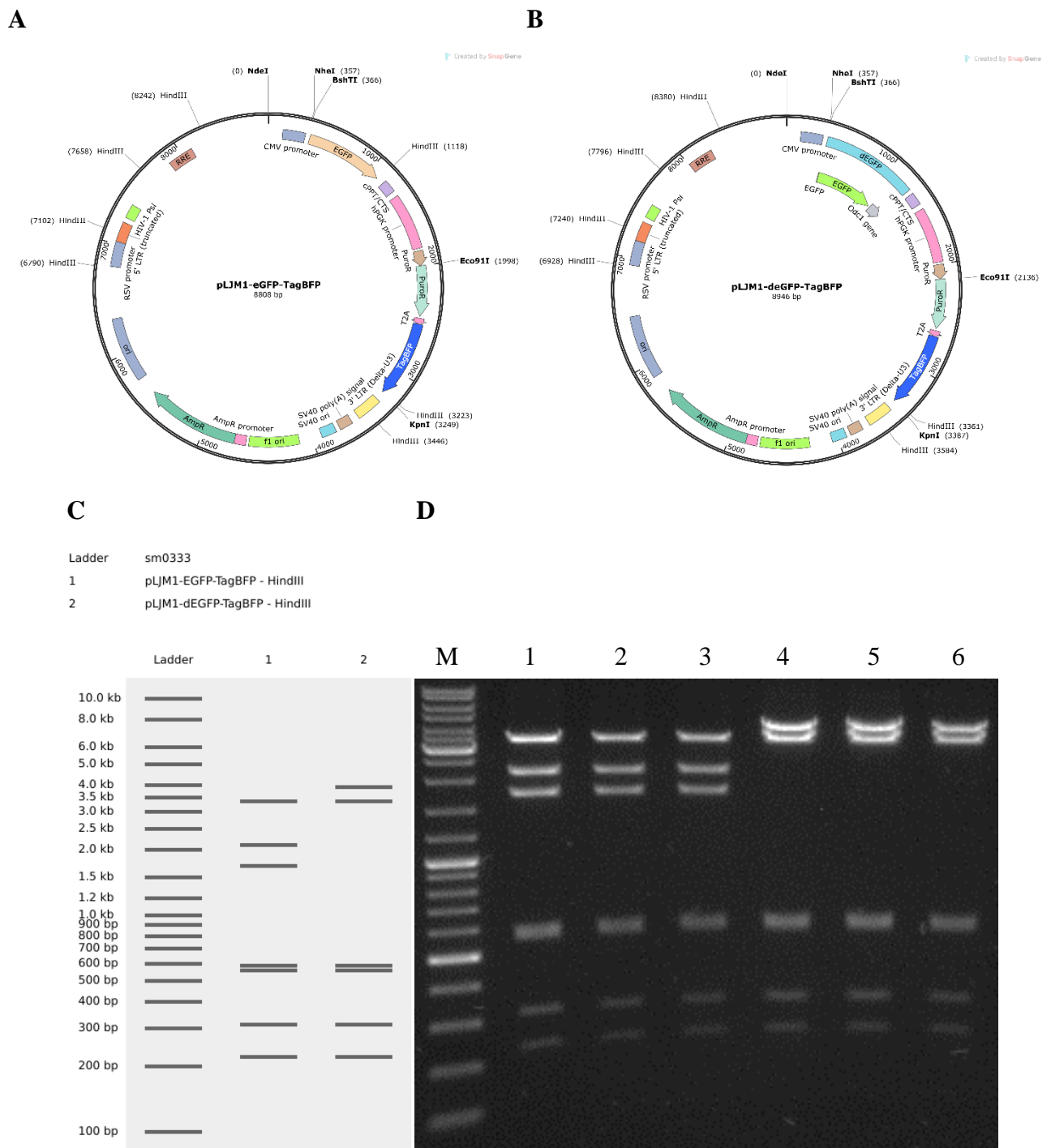
- a) YB_TATA – nelabai stiprus sintetinis promotorius, sukurtas 2014 metais. Turi labai žemą bazinį aktyvumą ir pakankamai aukštą indukcijos lygį (Ede et al., 2016).

b) minCMVmod (T4 versija) – stiprus minimalus CMV promotorius su sumažintu „tekėjimu“ (angl. *leaking*). Skirtumai nuo standartinio: pridėtas TFIIB atpažinimo motyvas bei TATA-dėžutė pakeista į kanoninę (Loew et al., 2010).

Be to, kaip fluorescencinių baltymų genai buvo pasirinkti eGFP ir deGFP. Tačiau, versijos su deGFP taip ir nebuvo panaudotos. Buvo įvestas dar vienas atnaujinimas: TagBFP genas po konstitutyvaus hPGK promotoriaus kontrole. Tai buvo skirta provirusų skaičiaus, patekusių į ląsteles nustatymui.

3.4.1. pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP konstravimas

TagBFP genas buvo subklonuotas į taikinius plazmidus, iškirpus puromicino atsparumo geno 5' regioną iš pLJM1-eGFP bei pLJM1-deGFP plazmidžių, bei pakeitus į tą patį regioną, bet su panaikintu STOP kodonu ir T2A-TagBFP seka. (3.4.1.1 pav.).



3.4.1.1 pav. A – pLJM1-eGFP-TagBFP restrikinis žemėlapis;

B – pLJM1-deGFP-TagBFP restrikinis žemėlapis;

C – pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP restrikinė analizė su HindIII *in silico*;

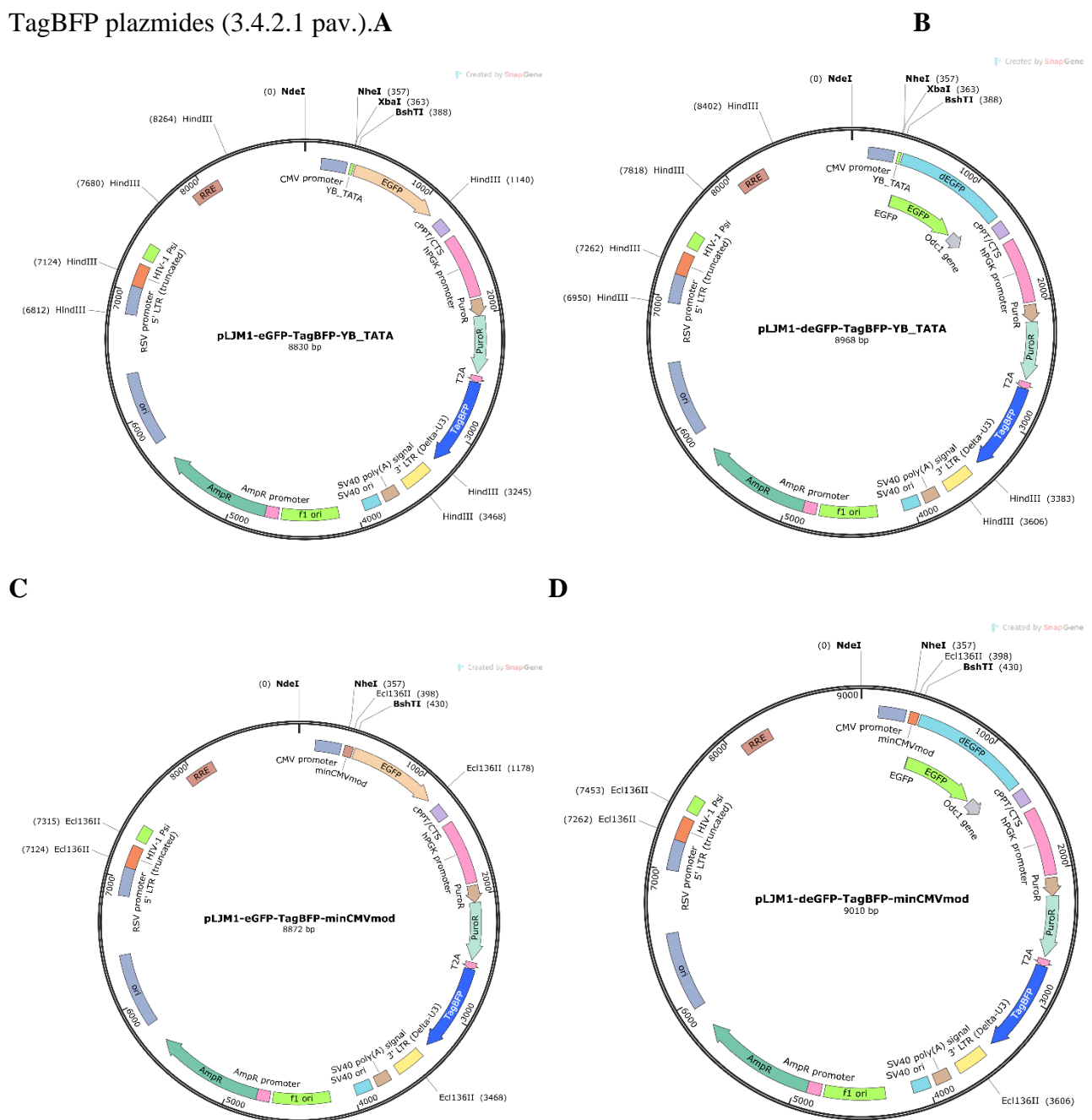
D – pLJM1-eGFP-TagBFP bei pLJM1-deGFP-TagBFP plazmidžių klonų restrikinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 1% agaroziniame gelyje

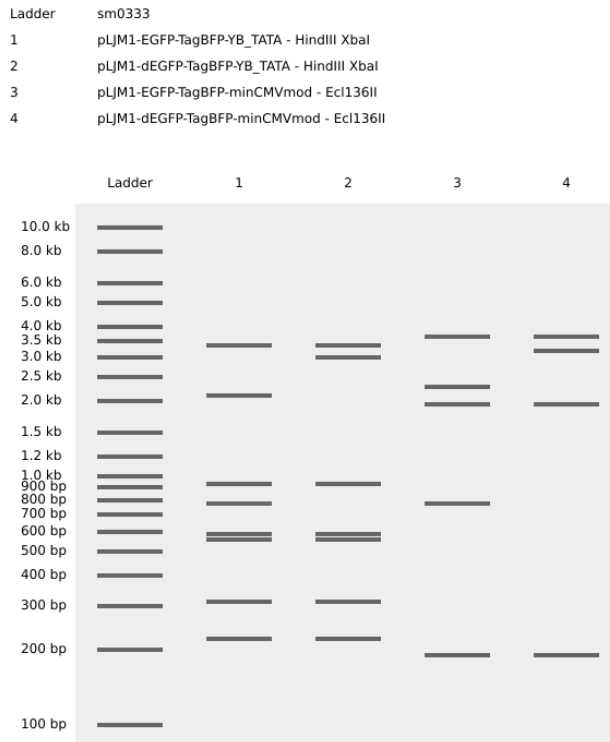
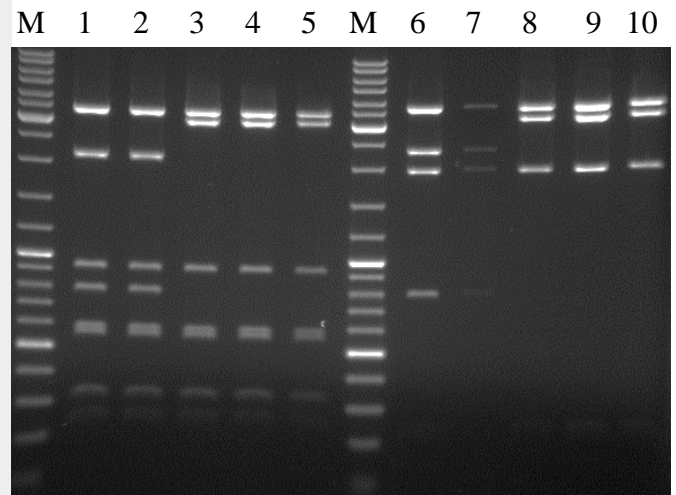
M – atitinka takelį su DNR markeriu sm0333; 1-3 takeliai atitinka pLJM1-eGFP-TagBFP trijų klonų restriktinės analizės rezultatus; 4-6 takeliai atitinka pLJM1-deGFP-TagBFP 3 klonų restriktinės analizės rezultatus.

Kaip matoma, iš 3.4.1.1 pav., buvo gauti pLJM1-eGFP-TagBFP konstrukto 3 teigiami klonai, jo deGFP versijos irgi 3. Tolimesniems darbams buvo panaudoti pLJM1-eGFP-TagBFP 2 ir pLJM1-deGFP-TagBFP 3 klonai.

3.4.2. pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA, pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod bei deGFP versijų plazmidžių konstravimas

YB-TATA bei minCMVmod minimalūs promotoriai buvo užsakyti oligonukleotidų pavidalu. Tuomet oligonukleotidai buvo sulydyti ir klonuoti į pLJM1-eGFP-TagBFP ir pLJM1-deGFP-TagBFP plazmides (3.4.2.1 pav.).A



E**F**

3.4.2.1 pav. A – pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA restrikcinis žemėlapis;

B – pLJM1-deGFP-TagBFP-YB_TATA restrikcinis žemėlapis;

C – pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod restrikcinis žemėlapis;

D – pLJM1-deGFP-TagBFP-minCMVmod restrikcinis žemėlapis

E – Aukščiau išvardintų konstruktų su YB_TATA restrikcinė analizė

su HindIII bei XbaI, aukščiau išvardintų konstruktų su minCMVmod restrikcinė analizė su Ecl136II *in silico*;

F – Aukščiau išvardintų plazmidžių klonų restrikcinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 1% agaroziniame gelyje

M – atitinka takelius su DNR markeriu sm0333; 1, 2 takeliai atitinka pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA 2 klonų restrikcinės analizės rezultatus; 3-5 takeliai atitinka pLJM1-deGFP-TagBFP-YB_TATA 3 klonų restrikcinės analizės rezultatus; 6, 7 takeliai atitinka pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod 2 klonų restrikcinės analizės rezultatus; 8-10 takeliai atitinka pLJM1-deGFP-TagBFP-minCMVmod 3 klonų restrikcinės analizės rezultatus.

Kaip galima spręsti iš 3.4.2.1 pav., buvo gauta pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA konstrukto 2 teigiami klonai, pLJM1-deGFP-TagBFP-YB_TATA – 3 teigiami klonai, pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod – 2 teigiami klonai, pLJM1-deGFP-TagBFP-minCMVmod konstrukto – 3 teigiami klonai. Tolimesniems darbams buvo pasirinkti 1 konstrukto – 2 klonas, 2 konstrukto – 2 klonas, 3 konstrukto – 1 klonas, 4 konstrukto – 1 klonas.

3.4.3. Modifikuoto P53 reporterio versijų galutinių konstruktų sukūrimas ir jų validavimas

Viengubas ir trigubas P53 atsako elementai buvo užsakyti oligonukleotidų pavidalu. Tuomet jie buvo suldyti bei klonuoti į plazmides, aprašytas praeitame skyrelyje, iškirpus CMV promotorių. Konstruojant kontrolines plazmides, CMV promotorius buvo iškirptas, o lipnūs galai užbukinti.

Taip buvo gautos plazmidės be CMV promotoriaus ir P53 atsako elementų, tačiau su minimaliais promotoriais. Iš viso buvo gauta 12 galutinių konstrukčių:

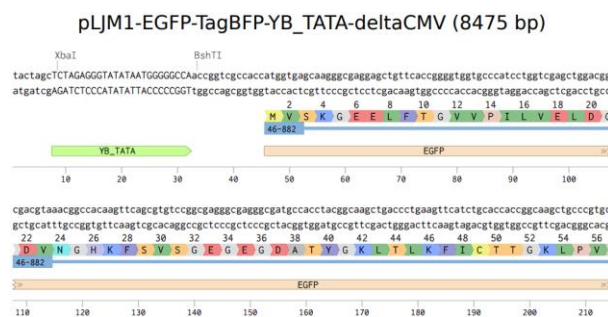
pLJM1-eGFP-TagBFP su YB_TATA minimaliu promotoriumi be ir su viengubu ir trigubu P53 atsako elementais;

pLJM1-eGFP-TagBFP su minCMVmod minimaliu promotoriumi be ir su viengubu ir trigubu P53 atsako elementais;

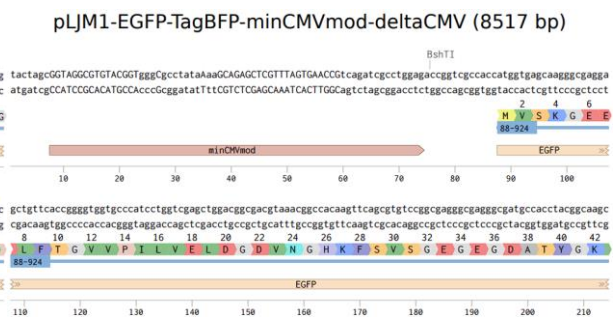
pLJM1-deGFP-TagBFP su YB_TATA minimaliu promotoriumi be ir su viengubu ir trigubu P53 atsako elementais;

pLJM1-deGFP-TagBFP su minCMVmod minimaliu promotoriumi be ir su viengubu ir trigubu P53 atsako elementais (3.4.3.1 pav.).

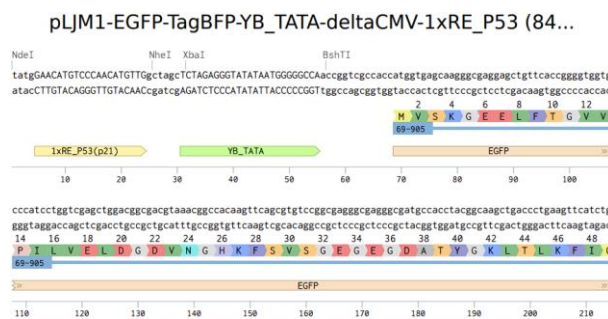
A



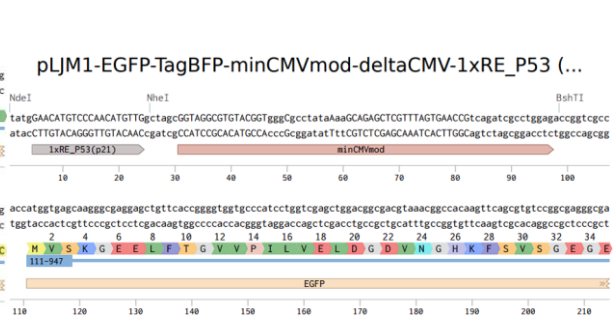
B



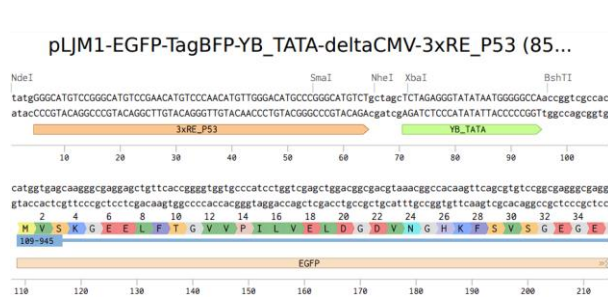
C



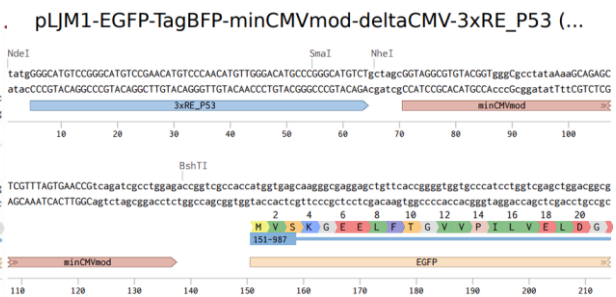
D



E

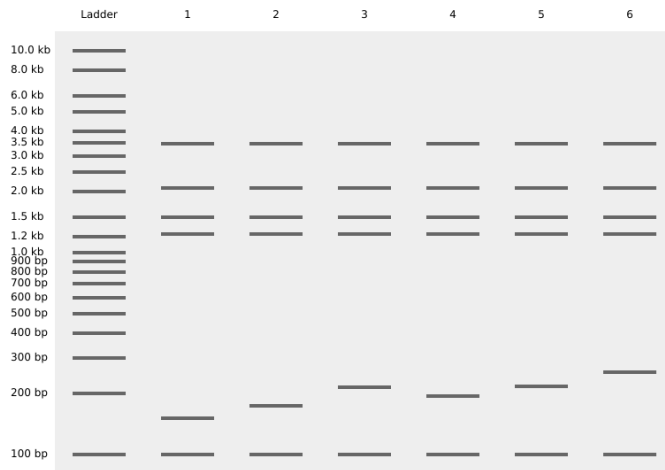
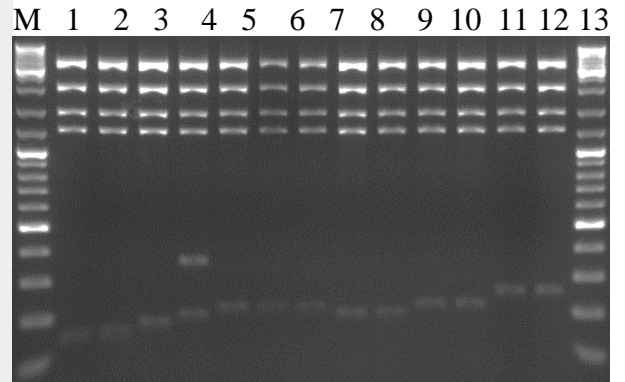


F

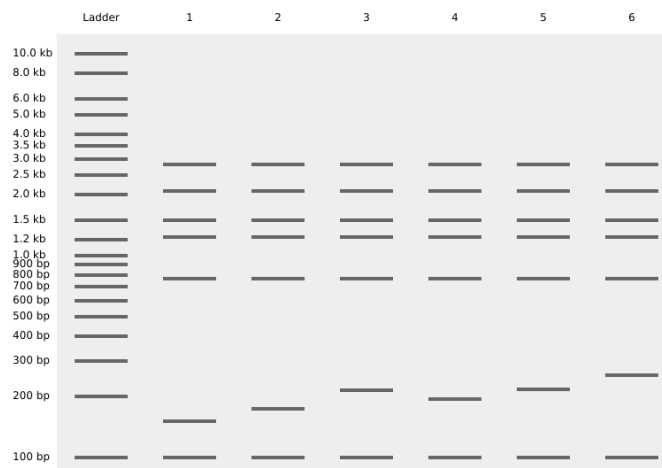
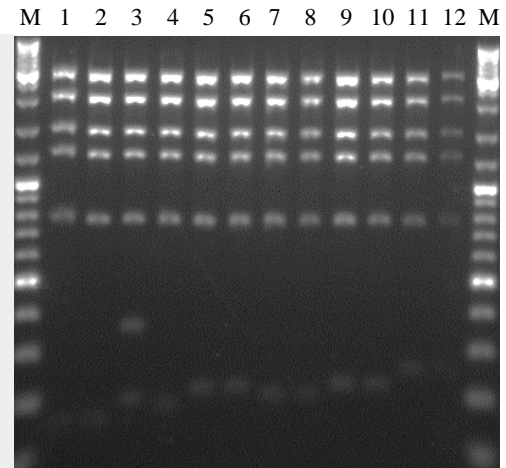


G

Ladder sm0333
 1 pLJM1-EGFP-TagBFP-YB_TATA-deltaCMV - NcoI VspI
 2 pLJM1-EGFP-TagBFP-YB_TATA-deltaCMV-1xRE_P53 - NcoI VspI
 3 pLJM1-EGFP-TagBFP-YB_TATA-deltaCMV-3xRE_P53 - NcoI VspI
 4 pLJM1-EGFP-TagBFP-minCMVmod-deltaCMV - NcoI VspI
 5 pLJM1-EGFP-TagBFP-minCMVmod-deltaCMV-1xRE_P53 - NcoI VspI
 6 pLJM1-EGFP-TagBFP-minCMVmod-deltaCMV-3xRE_P53 - NcoI VspI

**H****I**

Ladder sm0333
 1 pLJM1-dEGFP-TagBFP-YB_TATA-deltaCMV - NcoI VspI
 2 pLJM1-dEGFP-TagBFP-YB_TATA-deltaCMV-1xRE_P53 - NcoI VspI
 3 pLJM1-dEGFP-TagBFP-YB_TATA-deltaCMV-3xRE_P53 - NcoI VspI
 4 pLJM1-dEGFP-TagBFP-minCMVmod-deltaCMV - NcoI VspI
 5 pLJM1-dEGFP-TagBFP-minCMVmod-deltaCMV-1xRE_P53 - NcoI VspI
 6 pLJM1-dEGFP-TagBFP-minCMVmod-deltaCMV-3xRE_P53 - NcoI VspI

**J**

3.4.3.1 pav. A, B, C, D, E, F – svarbiausio konstruktų regiono seka su restrikcijos endonukleazių motyvais, eGFP geno skaitymo rėmelio pradžia ir nurodytomis klonuotomis sekomis:

A – pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA- Δ CMV;

B – pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod- Δ CMV;

C – pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA- Δ CMV-1 \times RE_P53;

D – pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod- Δ CMV-1 \times RE_P53;

E – pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA- Δ CMV-3 \times RE_P53;

F – pLJM1-eGFP-TagBFP-minCMVmod- Δ CMV-3 \times RE_P53

G – aukščiau nurodytų konstruktų restrikcinė analizė su NcoI ir VspI *in silico*;

H – aukščiau išvardintų plazmidžių klonų restrikcinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 2% agaroziniame gelyje

M – atitinka takelius su DNR markeriu sm0333; 1, 2 takeliai – A konstruktas; 3, 4 takeliai – C konstruktas; 5 – 7 takeliai – E konstruktas; 8, 9 takeliai – B konstruktas; 10, 11 takeliai – D konstruktas; 12, 13 takeliai – F konstruktas.

I – aukščiau nurodytų konstruktų deGFP versijų restrikcinė analizė su NcoI ir VspI *in silico*;

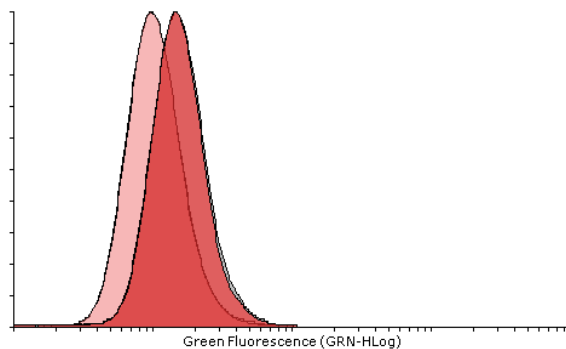
J – aukščiau išvardintų plazmidžių deGFP versijų klonų restrikcinės analizės rezultatų vizualizavimas naudojant elektroforezę 2% agaroziniame gelyje

M – atitinka takelius su DNR markeriu sm0333; 1, 2 takeliai – A konstrukto deGFP atitikmuo; 3, 4 takeliai – C konstrukto deGFP atitikmuo; 5, 6 takeliai – E konstrukto deGFP atitikmuo; 7, 8 takeliai – B konstrukto deGFP atitikmuo; 9, 10 takeliai – D konstrukto deGFP atitikmuo; 11, 12 takeliai – F konstrukto deGFP atitikmuo.

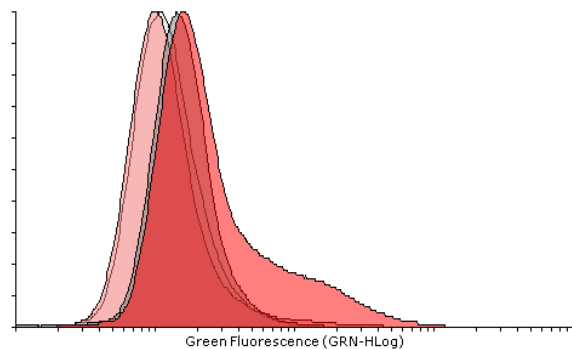
Kaip matoma iš 3.4.3.1 pav., visų konstruktų klonai buvo teigiami išskyrus pLJM1-eGFP-TagBFP-YB_TATA- Δ CMV-1RE_P53 antrą kloną ir pLJM1-deGFP-TagBFP-YB_TATA- Δ CMV-1 \times RE_P53 pirmą kloną. eGFP plazmidžių klonai iš 1, 3, 5, 8, 11, 13 takelių bei deGFP plazmidžių klonai 1, 3, 5, 7, 10, 11 buvo nusiūsti sekoskaitai. Buvo atlikta sekoskaita 3.4.3.1abcdef pav. pavaizduotų plazmidžių regionų (duomenys neparodyti). Visi klonai buvo teigiami.

Atitinkami eGFP plazmidžių klonai buvo sėkmingai panaudoti atitinkamų HCT-P ir HCT-P-p53^{-/-} ląstelių linijų išvedimui (mirm lentelė). Tuomet buvo atlikta P53 indukcija su nutlino ir oksaliplatinos standartinėmis koncentracijomis (3.4.3.2 pav.).

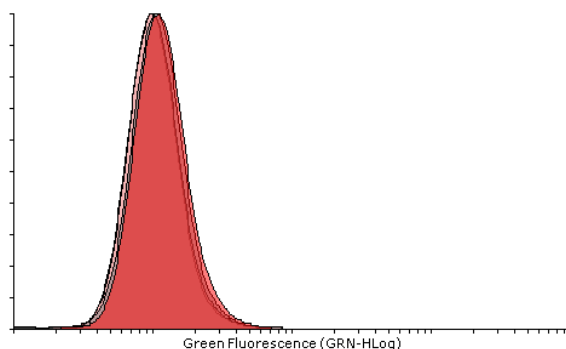
A



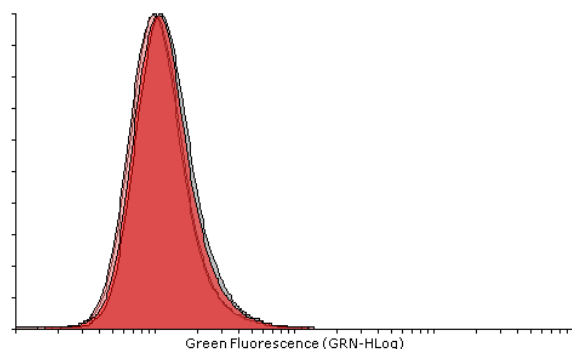
B

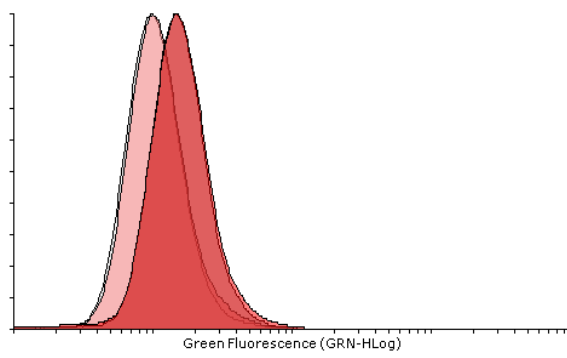
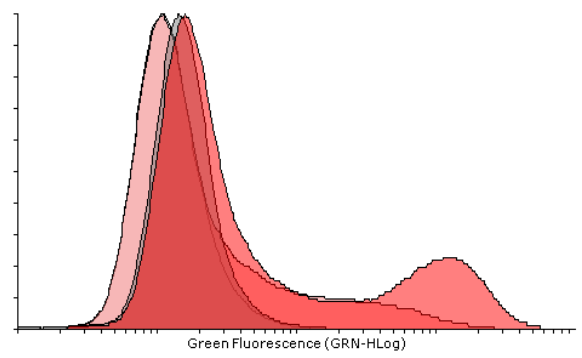
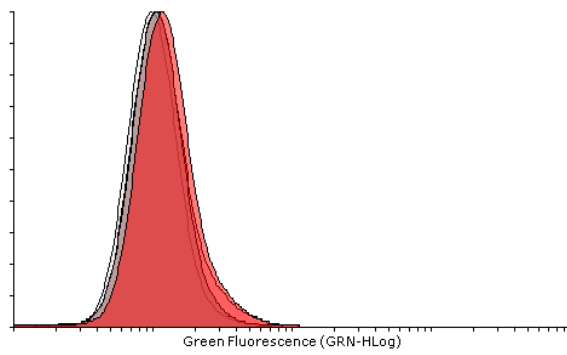
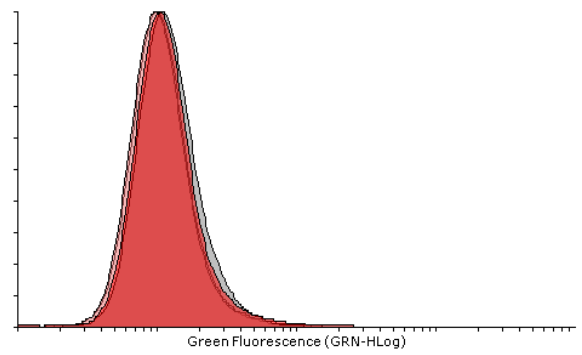
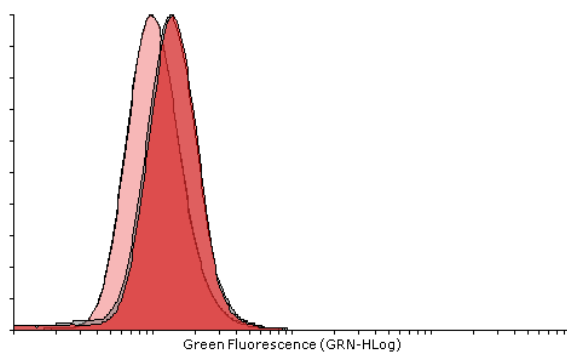
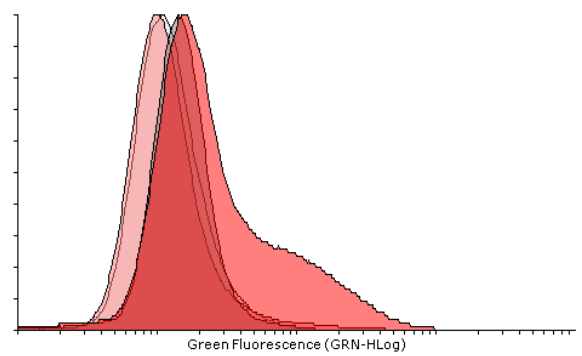
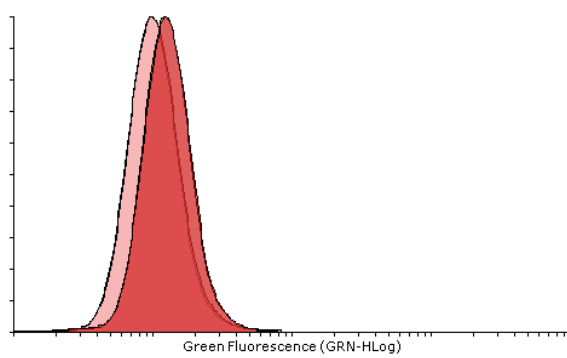
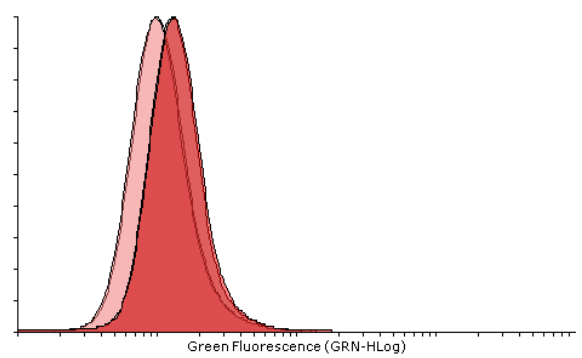


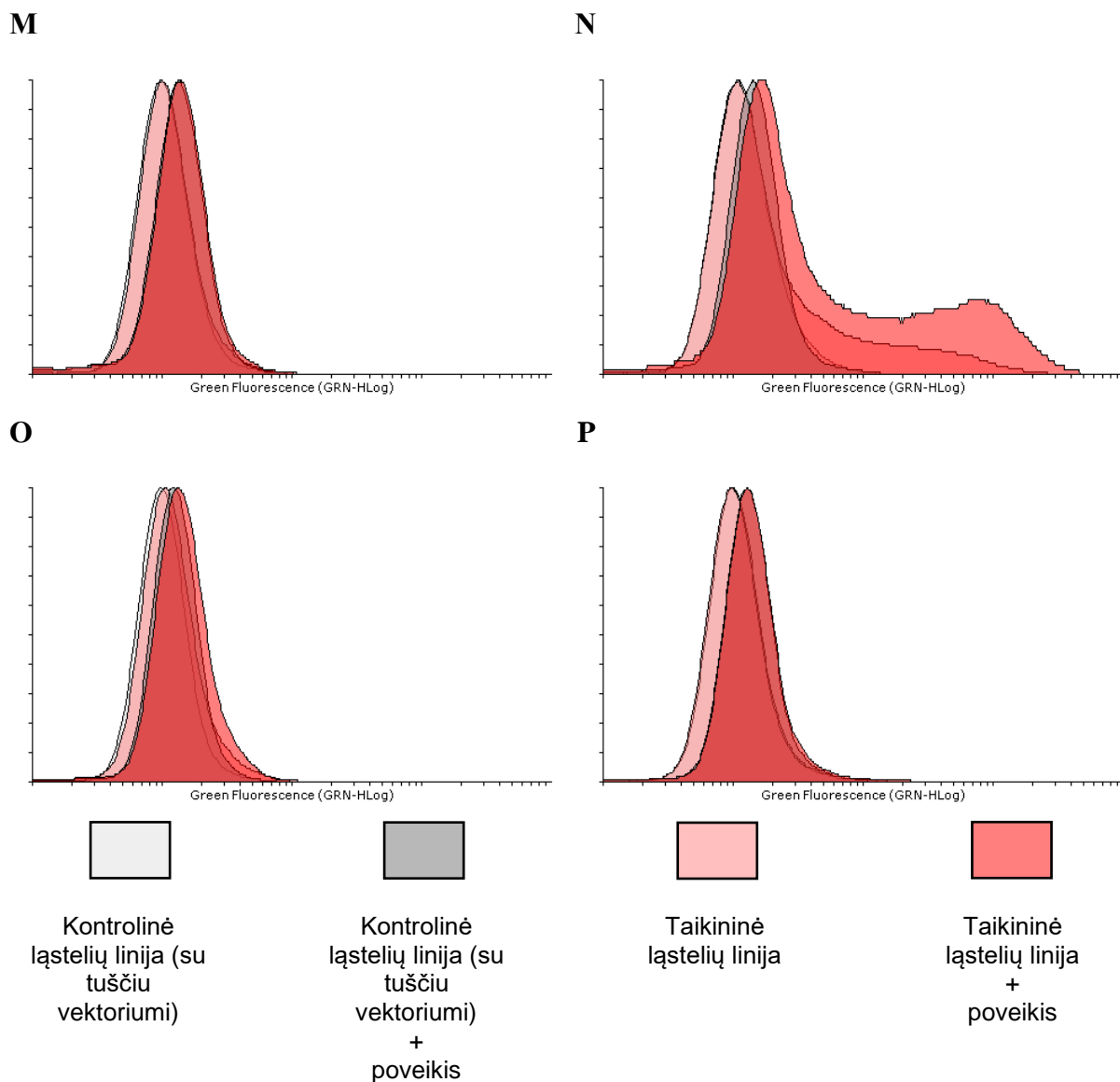
C



D



E**F****G****H****I****J****K****L**



3.4.3.2 pav. eGFP signalo intensyvumas priklausomai nuo ląstelių linijų ir 20 μ M nutlino bei 50 μ M oksaliplatinos 24 val. poveikių – reprezentatyvios tėkmės citometrijos duomenų histogramos (buvo atlikti 2 biologiniai pakartojimai):

- A – Kontrolinė linija – HCT-P-YB_TATA, taikininė – HCT-P-1×RE_P53-YB_TATA, poveikis – 20 μ M nutlino;
- B – Kontrolinė linija – HCT-P-minCMVmod, taikininė – HCT-P-1×RE_P53-minCMVmod, poveikis – 20 μ M nutlino;
- C – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-YB_TATA, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-1×RE_P53-YB_TATA, poveikis – 20 μ M nutlino;
- D – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-minCMVmod, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-1×RE_P53-minCMVmod, poveikis – 20 μ M nutlino;
- E – Kontrolinė linija – HCT-P-YB_TATA, taikininė – HCT-P-3×RE_P53-YB_TATA, poveikis – 20 μ M nutlino;
- F – Kontrolinė linija – HCT-P-minCMVmod, taikininė – HCT-P-3×RE_P53-minCMVmod, poveikis – 20 μ M nutlino;
- G – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-YB_TATA, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-3×RE_P53-YB_TATA,

poveikis – 20 μ M nutlino;

H – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-minCMVmod, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-3 \times RE_P53-minCMVmod, poveikis – 20 μ M nutlino;

I – Kontrolinė linija – HCT-P-YB_TATA, taikininė – HCT-P-1 \times RE_P53-YB_TATA, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

J – Kontrolinė linija – HCT-P-minCMVmod, taikininė – HCT-P-1 \times RE_P53-minCMVmod, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

K – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-YB_TATA, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-1 \times RE_P53-YB_TATA, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

L – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-minCMVmod, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-1 \times RE_P53-minCMVmod, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

M – Kontrolinė linija – HCT-P-YB_TATA, taikininė – HCT-P-3 \times RE_P53-YB_TATA, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

N – Kontrolinė linija – HCT-P-minCMVmod, taikininė – HCT-P-3 \times RE_P53-minCMVmod, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

O – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-YB_TATA, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-3 \times RE_P53-YB_TATA, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos;

P – Kontrolinė linija – HCT-P-p53^{-/-}-minCMVmod, taikininė – HCT-P-p53^{-/-}-3 \times RE_P53-minCMVmod, poveikis – 50 μ M oksaliplatinos.

Kaip galima pastebėti iš 3.4.3.2 pav., ląstelių linijos su YB_TATA minimaliu promotoriumi nereaguoja nei į nutlino, nei į oksaliplatinos poveikius nepriklausomai nuo P53 atsako elementų skaičių (jų atsakas nesiskiria nuo kontrolinių ląstelių linijų). minCMVmod minimaliu promotoriaus atveju P53^{+/+} ląstelių linijos reaguoja į poveikius kaip ir su nutlinu, taip ir su oksaliplatina. Atsako stiprumas priklauso nuo P53 atsako elementų skaičiaus. Matoma, jog P53^{-/-} ląstelių linijose nėra jokio atsako. Galima pastebėti, jog reaguoja tik maža dalis ląstelių.

REZULTATŲ APTARIMAS

Kaip galima pastebėti, visas suplanuotas konstravimas buvo atliktas sėkmingai.

Prieš aptariant biologinius rezultatus, reikėtų paminėti transkripcijos faktorių reporterių 3 vertinimo kriterijus:

- a) Veiklumas – ar reaguoja reporteris į transkripcijos faktoriaus buvimą ląstelėse?
- b) Specifiškumas – ar reaguoja būtent į tą transkripcijos faktorių?
- c) Jautrumas – kaip reporterio signalo intensyvumas priklauso nuo transkripcijos faktoriaus transkripcinio aktyvumo?
- d) Pritaikomumas – ar lengva pritaikyti konkrečią reporterio versiją?

Taigi, pradėdant nuo pritaikomumo. Kaip ir P21p-eGFP, P21p-deGFP bei YB_TATA, minCMVmod pagrįstų reporterių formos yra lentivirusinės transferinės plazmidės. Tai reiškia, jog jas galima pritaikyti tiek laikinajai transfekcijai, naudojant cheminius arba fizinius metodus, tiek ir lentivirusinei transdukcijai (biologinis transfekcijos metodas). Iš vienos pusės transfekcija yra žymiai daugiau prieinamas metodas. Ją būtų galima greitai ir efektyviai pritaikyti bet kurioje laboratorijoje, kuri turi leidimą dirbti su GMO. Dar vienas privalumas transfekcijos yra fluorescencinio signalo intensyvumas. Palyginus su transdukcija, fluorescencinio signalo intensyvumas gali skirtis 10 kartų ir daugiau (Ede et al, 2016). Darbui su lentivirusiniais vektoriais reikalingi specialūs leidimai ir atitinkami apsaugos metodai. Iš kitos pusės, taikant transfekciją labai kenčia specifiškumas, nes dažniausiai jos metu į skirtingas ląsteles patenka labai skirtingas plazmidžių kiekis. Kuo daugiau reporterinės plazmidės patenka į ląstelę, tuo didesnė nespecifikos rizika. Be to, tokioje plazmidėje turi būti „endogeninė kontrolė“ – papildomas fluorescencinio baltymo genas po konstitutyvaus promotoriaus kontrole tam, kad būtų galima normalizuoti reporterinio fluorescencinio baltymo signalą (Ede et al., 2016). Tokią kontrolę turi tik minCMVmod bei YB_TATA pagrįstų reporterių plazmidės. Iš kitos pusės, taikant lentivirusinę transdukciją labai mažėja nespecifškumo rizika, nes visada galima parinkti viruso titrą, kad MOI būtų 1 arba mažiau. Tada statistiškai tik vienas provirusas patenka į vieną ląstelę ir normalizavimo nebereikia. Kita vertus, transfekcijos ir transdukcijos efektyvumai priklauso nuo plazmidės ir proviruso sekų ilgio, atitinkamai. Šiuo atveju, akivaizdu, jog abiem atvejais minCMVmod bei YB_TATA pagrįsti reporteriai yra geresni: kaip ir teoriniai provirusų dydžiai, taip ir pačių plazmidžių dydžiai yra mažesni negu P21p-eGFP, P21p-deGFP reporterių. Taigi, pagal transfekcijos ir transdukcijos kriterijų, minCMVmod bei YB_TATA pagrįsti reporteriai yra geresni negu P21p-eGFP ir P21p-deGFP reporteriai.

Kita pritaikomumo dalis priklauso nuo fluorescencinio baltymo geno pasirinkimo. Kadangi GFP buvo istoriškai pirmas klonuotas fluorescencinio baltymo genas, beveik visos fluorescencinių

signalų detekcijos sistemos, pavyzdžiui, konfokaliniai ir fluorescenciniai mikroskopai, tėkmės citometrai turi atitinkamus lazerius ir filtrus (Prasher et al., 1992). Taigi, šiuo atveju ir P21p-eGFP ir P21p-deGFP bei YB_TATA bei minCMVmod pagrįsti reporteriai yra ekvivalenčiai.

Kitas svarbus kriterijus yra veiklumas. Šiuo atveju ir P21p, ir minCMVmod pagrįsti reporteriai teigiamai reaguoja į teigiamą P53 statusą bei jo aktyvinimą su induktoriais. Tačiau, YB_TATA pagrįsti reporterių variantai parodė neigiamą reakciją į P53 teigiamą statusą bei stimuliaciją su nutlinu ir oksaliplatinu. Tačiau, tai dar nereiškia, jog eGFP nesiekspresuoja atitinkamose ląstelėse: tai reiškia, jog eGFP signalo intensyvumas yra mažesnis negu autofluorescencijos signalo intensyvumas. Tam, kad būtų patikrinta ši hipotezė, būtų galima pritaikyti autofluorescencijos sumažinimo metodus (pavyzdžiui, konfokaliniai mikroskopai turi tokį privalumą) arba pasinaudoti kiekybiniu PGR. Taip pat, galima pasinaudoti laikinąja transfekcija (signalas gali padidėti 10 kartų ir daugiau palyginus su transdukuotomis su vienu provirusu ląstelėmis) (Ede et al., 2016). Visai tikėtina, jog, jei klonuotume, pavyzdžiui, 3-4 3xRE_P53 tandemus į plazmidę su tuo minimaliu promotoriumi, toks reporteris parodytų palyginamą su minCMVmod atsako profilį. Kita vertus, egzistuoja tikimybė, kad YB_TATA tiesiog neveikia HCT116 ląstelėse. Skirtingai nuo kitų naudojamų minimalių promotorių, šis yra visiškai sintetinis ir ypatingai trumpas (20 bp). Maža to, niekas iš tikrųjų nežino kaip jis veikia. Tačiau, YB_TATA turi labai patrauklias charakteristikas, tuomet mokslinių darbų skaičius, kur jis yra panaudotas, nuolat didėja (Greeshpan et al., 2022).

Specifiškumas yra pats svarbiausias kriterijus. Taigi, reikėtų pradėti nuo teorinės dalies. Kaip P21p, taip ir minCMVmod bei YB_TATA pagrįstose sistemose naudojami P53 atsako elementai (angl. *responsive elements*), kurie turi specifines sekas. Tačiau, P53 prastai iširtus homologus P63 ir P73, kurie sąveikauja su tomis pačiomis sekomis (Osada et al., 2006). Maža to, jų transkripcinis aktyvumas irgi didėja tomis pačiomis aplinkybėmis kaip ir P53. Šitos problemos sprendimo literatūroje nebuvo rasta. Tačiau, tikriausiai būtų galima sukurti tokį sintetinį elementą, su kuriuo sąveikautų tik P53, pritaikius, pavyzdžiui, atsitiktinę mutagenzę. Taigi, nagrinėjant P53 reporterių specifiškumą, visada reikia turėti omenyje, jog jis yra neišvengiamai kompromituotas.

Taigi, kaip parodė palyginimas tarp nepaveiktų HCT-P ir HCT-P-p53^{-/-} ląstelių linijų su P21p-eGFP bei P21p-deGFP konstruktais, deGFP reporterio versija yra specifiškesnė. Tačiau, atlikus P53 transkripcinio aktyvumo indukciją tas skirtumas pasirodė nereikšmingas. Kitas būdas įvertinti specifiškumą, išnagrinėti nutlino titravimo rezultatus. Matoma, jog regresijos koeficientas R^2 yra didesnis eGFP reporterio versijoje palyginus su deGFP, reiškia priklausomybė yra stipresnė. Taip pat reikėtų apžvelgti keistus oksaliplatinos titravimo rezultatus. Šiuo atveju įmanomi du paaiškinimai:

- a) Oksaliplatinos savybės. Žinoma, jog didelėmis koncentracijomis, oksaliplatinu stabdo replikaciją, transkripciją bei transliaciją (ref);

b) Oksaliplatinos žūties indukcija. Žinoma, jog vykstant ląstelinei žūčiai, eGFP fluorescencija nyksta.

Tačiau, P21p pagrįstų reporterių trūkumas yra tas, jog buvo klonuotas labai ilgas P21 promotoriaus regionas. Iš literatūros žinoma, jog ten yra daug kitų transkripcijos faktorių atpažinimo motyvų (Chung et al, 2002). Taigi, yra tikimybė, jog tam tikrose aplinkybėse, kurios nėra susijusios su P53, tas regionas bus aktyvuojamas arba slopinamas. Tuomet buvo nuspręsta sukurti reporterius minCMVmod bei YB_TATA pagrindu.

Teoriškai šitos versijos turi būti specifiskesnės, bet kaip yra iš tikrųjų? Poveikis fiksuotomis nutlino ir oksaliplatinos koncentracijomis parodė, jog minCMVmod pagrįstas reporteris yra daugiau specifinis negu reporteriai P21p pagrindu. Matoma, jog P53^{-/-} ląstelių linijose absoliučiai nėra skirtumų palyginus su kontrolėmis. Tačiau, galutinei išvadai trūksta 1 biologinio pakartojimo.

Taigi, galima padaryti tarpinę išvadą, jog minCMVmod pagrįsti reporteriai yra specifiskesni negu P21p pagrįsti.

Sekantis kriterijus yra jautrumas. P21p reporterių atveju svarbūs yra santykinis žalios fluorescencijos intensyvumas veikiant fiksuotomis P53 induktorių koncentracijomis ir nutlino titravimo rezultatai. Galima, pastebėti, jog santykinė P21p-eGFP indukcija yra didesnė negu P21p-deGFP veikiant ir oksaliplatiną ir nutlinu. Deja, skirtumai nėra statistiškai patikimi. Tačiau, kaip galima pamatyti iš nutlino titravimo regresinės analizės rezultatų, eGFP reporterio R² yra didesnis negu deGFP reporterio. Tai reiškia, jog eGFP reporterio signalas stipriau priklauso nuo didėjančios P53 induktoriaus koncentracijos, o tai reiškia, jog jis jautresnis negu deGFP reporteris. Lyginant minCMVmod pagrįstus reporterius su viengubu ir trigubu P53 atsako elementais, galima pamatyti, jog trigubos versijos atveju stebimi skirtumai tarp P53^{+/+} ir P53^{-/-} linijų, o viengubos versijos atveju – ne. Tuomet galima padaryti išvadą, jog minCMVmod reporterio versija su trigubu P53 atsako elementu yra jautresnė. Palyginti P21p bei minCMVmod pagrįstus reporterius negalima, nes trūksta statistinių duomenų.

Netikėtai tyrimų eigos metu atsirado dar vienas kriterijus – į stimuliaciją P53 bei P53 induktoriais reaguojančių ląstelių kiekis. Iš karto reikia pasakyti, jog šiuo atveju nebuvo atlikta jokių specialių matavimų. Visi pastebėjimai pagrįsti histogramų analize plika akimi. Taigi, kaip galima pamatyti, P21p reporterių atveju į P53 teigiamą statusą reaguoja dauguma ląstelių. Tačiau, po P53 transkripcinio aktyvumo indukcijos, nereaguojančių ląstelių dalis dar sumažėja, bet nedingsta. Šiuo atveju gali būti daug paaiškinimų. Vienas iš jų – kompromituota ląstelių atranka su antibiotiku po lentivirusinės transdukcijos. Tačiau, ta priežastis mažai tikėtina, nes stabilų ląstelių linijų išvedimo technika buvo gerai atidirbta Proteomikos centro laboratorijoje. Sekantis paaiškinimas gali būti tame, jog nereaguojančios ląstelės neturi arba turi inaktyvuotą P53 variantą. Šita priežastis yra pakankamai tikėtina, nes HCT116 ląstelių linija yra labai heterogeninė ir turi

mikrosatelitinį nestabilumą. Tačiau, HepG2 yra palyginus homogeninė linija, tačiau jos atveju irgi ne visos ląstelės atsako į P53 transkripcinio aktyvumo indukciją. Be to, panašus nefluorescuojančių ląstelių kiekis buvo stebimas kaip HCT116, taip ir HepG2 stabiliose ląstelių linijose, ekspresuojančiose eGFP ir deGFP po CMV promotoriaus kontrole. Taigi, labiausiai tikėtina trečia hipotezė – nefluorescuojančios ląstelės - tiesiog lentivirusinės transdukcijos artefaktas. Su didele tikimybe provirusas įsistatė į nepalankias genomo vietas tose ląstelėse ir eGFP ekspresija yra slopinama. Šitos hipotezės trukumas yra tas, jog puromicino atsparumo geno ekspresija visgi vyksta (kitai ląstelėse nepraeitų atrankos).

Nagrinėjant linijas su minCMVmod reporterio variantais, pastebima, jog į P53 teigiamą statusą be poveikių reaguoja tik linija su trigubu P53 atpažinimo elementu. Nutlino ir oksaliplatinos poveikių atveju reaguoja ir sistema su viengubu variantu. Tačiau, abejais atvejais reaguoja tik palyginus maža ląstelių frakcija. Kodėl taip vyksta – įdomus klausimas. Pirma hipotezė šiuo atveju būtų – blogai pavykusi lentivirusinė transdukcija. Tačiau, šiuo atveju į vektorius buvo įvestas TagBFP baltymo genas po hPGK promotoriaus kontrole (kaip ir puromicino atsparumo genas). Fluorescencinė mikroskopija parodė, jog 90% ląstelių visų išvestų linijų su YB_TATA ir minCMVmod pagrįstais konstruktais fluorescuoja mėlynai. Tai reiškia, jog lentivirusinė transdukcija ir atranka su antibiotiku pavyko. Kitas paaiškinimo variantas yra minCMVmod promotoriaus modifikacijos. Šiuo atveju reikėtų žinoti, jog „TET ON“ sistema iš pCW57 (Puro) vektoriaus yra pagrįsta minimaliu CMV promotoriumi. Kaip matoma, HCT-P-ieGFP linijos eGFP ekspresijos indukcija pavyko ir dauguma ląstelių sėkmingai pradėjo fluorescuoti. Tačiau, minCMV minimalaus promotoriaus žinoma problema yra „tekėjimas“. Tam, kad jį sumažinti buvo įvestos dvi modifikacijos: pridėtas TFIIB transkripcijos faktoriaus atpažinimo motyvas ir TATA-dėžutės seka buvo pakeista į kanoninę (Loew et al, 2010). Mažai tikėtina, jog TATA-dėžutės sekos pakeitimas sukėlė tokias pasekmes. Iš kitos pusės buvo parodyta, jog TFIIB atpažinimo motyvą turintys genų promotoriai yra supresuojami genotoksinio streso metu (Shandilya et al., 2012). O oksaliplatiną tikrai sukelia genotoksinį stresą (Allgayer et al., 2019). Iš kitos pusės, nutlinas yra specifinis MDM2 inhibitorius, tačiau jis irgi sukelia panašų efektą. Tačiau, yra duomenų, kad šitas cheminis junginys irgi gali sukelti genotoksinį stresą! Šiuo atveju, panašu, jog reaguoja ląstelės, kuriose yra mažai TFIIB transkripcijos faktoriaus. Egzistuoja ir trečias paaiškinimas. Iš 5' galo nuo reporterių P53 atsako elementų buvo atrasta nepilna žmogaus U6 promotoriaus seka (apie 75% ilgio be 3' galo). U6 promotorius – trečios RNR polimerazės promotorius. O trečia RNR polimerazė sąveikaudama su DNR neduoda prisijungti antrai RNR polimerazei, dėl ko eGFP geno ekspresija nevyksta. Šiuo atveju reguojančios ląstelės – tos ląstelės, kuriose yra mažiausiai polimerazės. Jei būtų daugiau laiko tyrimams, būtų atlikti tokie veiksmai:

1. U6 promotoriaus likučių pašalinimas iš minCMVmod pagrįstų konstrukty;

2. minCMVmod minimalaus promotoriaus pakeitimas į nemodifikuotą versiją.

Dabar reikėtų apžvelgti P21p-eGFP reporterio pritaikymą. Apibendrinus eksperimentus su HepG2 su didele tikimybe galima teigti, jog šita linija turi aktyvų ir funkcionalų P53. Tačiau, P53 funkcionalumo įvertinimas panaudojant P53 fluorescencinį reporterį – labai netiesioginis būdas norint pasiekti tokį tikslą. Iš pradžių reikėjo pabandyti įvertinti P53 funkcionalumą paprastesniais būdais. Pavyzdžiui, imunofluorescenciniu metodu arba jo taikinių genų kPGR.

PC1 ir PC2 linijų atveju, kaip jau buvo pasakyta, buvo aptikta nauja *TP53* c.1025delG mutacija, kurios nėra standartinėse duomenų bazėse. Šita mutacija egzistuoja P53 C-gale: tetramerizacijos domeno gale. Dėl rėmelio poslinkio dingsta sekantis C-reguliacinis domenas. Kaip tetramerizacijos domenas, taip ir C-reguliacinis domenas labai svarbūs P53 transkripciniam aktyvumui teorijoje. Kaip parodė eksperimentas su PC1-P21p-eGFP ir PC2-P21p-eGFP linijomis, šitas galioja ir praktikai. Tačiau, faktas, jog šitos linijos nesureagavo į P53 transkripcinio aktyvumo indukciją yra tiesiog stiprus argumentas, bet ne įrodymas, jog P53 su c.1025delG mutacija neturi transkripcinio aktyvumo. Visų pirma, P53 induktoriai galėjo nepatekti į PC1 ir PC2 ląsteles. Tačiau, buvo išnagrinėtas PC1 ir PC2 linijų FCS/SSC pasiskirstymai be ir su poveikiais (duomenys neparodyti). Jie skyrėsi. Reiškia, ląstelių morfologija buvo pasikeitusi esant poveikiams. Visų antra, P53 „upstream“ arba „downstream“ galėjo būti neveiklūs šitose ląstelėse, nes P53 aktyvacijai reikia atitinkamų fosforilinimų, bei jo taikinių genų promotoriai neturi būti nutildyti. Tačiau, mažai tikėtina, jog P21 promotoriaus regionas įvestas su eGFP genu būtų taip greitai nutildytas visose ląstelėse. Galų gale, tam, kad būtų galima tvirtinti, jog P53 su c.1025delG mutacija neturi transkripcinio aktyvumo, reikia subklonuoti jo seką į vektorius su „TET ON“ sistema, įvesti į HCT-P-p53^{-/-}-P21p-eGFP ląsteles, pabandyti indukuoti P53 raišką skirtingomis doksiciklino koncentracijomis be ir su P53 induktoriais nutlinu ir oksaliplatina. Tik tada būtų galima padaryti galutinę išvadą.

IŠVADOS

1. Higromicino atsparumo genas buvo sėkmingai pakeistas į puromicino atsparumo geną „TET ON“ sistemos vektoriuje;
2. PEST seka buvo sėkmingai klonuota į pEGFP-C2 vektorių, eGFP bei deGFP genų sekos buvo sėkmingai subklonuotos į „TET ON“ sistemos vektorių, atitinkamos ląstelių linijos buvo išvestos ir eGFP bei deGFP signalų intensyvumų palyginimas parodė, jog PEST seka yra veikli;
3. P21 promotoriaus seka buvo sėkmingai klonuota į pJET vektorių, buvo atlikta jos sekoskaita, toliau ji buvo subklonuota į galutinius vektorius su eGFP bei deGFP genais, išvestos atitinkamos ląstelių linijos bei parodyta, jog abi sistemos yra veiklios ir pakankamai specifinės P53;
4. Buvo nustatytas P53 transkripcinis aktyvumas HepG2 ląstelių linijoje;
5. PC1 ir PC2 ląstelių linijų *TP53* koduojančio regiono sekoskaita buvo sėkmingai atlikta, aptikta homozigotinė c.1025delG mutacija bei buvo parodyta, jog P53 su šita mutacija neturi transkripcinio aktyvumo nurodytose ląstelių linijose;
6. P53 fluorescencinio reporterio specifiskumas buvo sėkmingai padidintas, panaudojant viengubo ir trigubo P53 atsako elementų bei minCMVmod minimalaus promotoriaus derinius vietoj P21 promotoriaus. Tačiau, šitie reporterio variantai veikė tik mažoje ląstelių dalyje.

ASMENINIO INDĒLIO APRAŠYMAS

Absoliučiai visi darbai, planavimai išskyrus P53 transkripcinio reporterio kūrimo idėją.

PADĖKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti Proteomikos centro kolektyvui, ypač dr. Mindaugui Valiui už įdomų uždavinį, iš kurio gavosi šitas darbas, turiningus pokalbius apie mokslą ir naudingus patarimus bei, aišku, leidimą atlikti šitą darbą. Taip pat atskirai noriu padėkoti dr. Marijai Ger už PC1 ir PC2 ląstelių linijų kDNR, biochemijos doktorantui Juliui Žukui ir (?) pirmos pakopos studentui Mantui Špakovui. Malonu buvo dirbti kartu.

Ypač noriu padėkoti biologijos doktorantei Monikai Iešmantaitėi už moralinį palaikymą, įdomius klausimus ir pagalbą ruošiant šitą darbą. Ji atsakinga už tą, jog šitas darbas tapo lengviau skaitomas.

Taip pat noriu padėkoti BCHI Biologinių modelių skyriui už C57BL/6J pelių kDNR.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abu El Maaty, M. A., Strassburger, W., Qaiser, T., Dabiri, Y., & Wöfl, S. (2017). Differences in p53 status significantly influence the cellular response and cell survival to 1,25-dihydroxyvitamin D3-metformin cotreatment in colorectal cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 56(11), 2486–2498. <https://doi.org/10.1002/mc.22696>
- Allgayer, N., de Campos, R. A., Gonzalez, L. P. F., Flores, M. do A., Dihl, R. R., & Lehmann, M. (2019). Evaluation of mutagenic activity of platinum complexes in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110782. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110782>
- Anderson, M. E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P., & Tegtmeier, P. (1997). Reciprocal Interference between the Sequence-Specific Core and Nonspecific C-Terminal DNA Binding Domains of p53: Implications for Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(11), 6255–6264. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6255>
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., & Vogelstein, B. (1989). Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science*, 244(4901), 217–221. <https://doi.org/10.1126/science.2649981>
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., & Prives, C. (2002). The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205015>
- Berger, M., Sionov, R. V., Levine, A. J., & Haupt, Y. (2001). A Role for the Polyproline Domain of p53 in Its Regulation by Mdm2 *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 3785–3790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008879200>
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrc1455>

- Brady, C. A., Jiang, D., Mello, S. S., Johnson, T. M., Jarvis, L. A., Kozak, M. M., Broz, D. K., Basak, S., Park, E. J., McLaughlin, M. E., Karnezis, A. N., & Attardi, L. D. (2011). Distinct p53 Transcriptional Programs Dictate Acute DNA-Damage Responses and Tumor Suppression. *Cell*, *145*(4), 571–583. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.035>
- Chung, C. T., & Miller, R. H. (1993). Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods in Enzymology*, *218*, 621–627. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)18045-e](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)18045-e)
- Chung, Y. W., Jeong, D., Won, J. Y., Choi, E.-J., Choi, Y. H., & Kim, I. Y. (2002). H₂O₂-induced AP-1 activation and its effect on p21(WAF1/CIP1)-mediated G₂/M arrest in a p53-deficient human lung cancer cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *293*(4), 1248–1253. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00360-1)
- Corish, P., & Tyler-Smith, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Engineering, Design and Selection*, *12*(12), 1035–1040. <https://doi.org/10.1093/protein/12.12.1035>
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S., & Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, *356*(6366), Article 6366. <https://doi.org/10.1038/356215a0>
- Ede, C., Chen, X., Lin, M.-Y., & Chen, Y. Y. (2016). Quantitative Analyses of Core Promoters Enable Precise Engineering of Regulated Gene Expression in Mammalian Cells. *ACS Synthetic Biology*, *5*(5), 395–404. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00266>
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics*, *1*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>
- Gabizon, R., Brandt, T., Sukenik, S., Lahav, N., Lebediker, M., Shalev, D. E., Veprintsev, D., & Friedler, A. (2012). Specific Recognition of p53 Tetramers by Peptides Derived from p53 Interacting Proteins. *PLOS ONE*, *7*(5), e38060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038060>
- Greenshpan, Y., Sharabi, O., Yegodayev, K. M., Novoplansky, O., Elkabets, M., Gazit, R., & Porgador, A. (2022). The Contribution of the Minimal Promoter Element to the Activity of Synthetic

Promoters Mediating CAR Expression in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms23137431>

Halazonetis, T. d., & Kandil, A. n. (1993). Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *The EMBO Journal*, 12(13), 5057–5064. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06199.x>

Harris, C. C. (1996). Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(20), 1442–1455. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.20.1442>

Hernández Borrero, L. J., & El-Deiry, W. S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1876(1), 188556. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., & Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature*, 460(7259), Article 7259. <https://doi.org/10.1038/nature08235>

Jain, A. K., & Barton, M. C. (2018). p53: Emerging roles in stem cells, development and beyond. *Development*, 145(8), dev158360. <https://doi.org/10.1242/dev.158360>

Jordan, J. J., Menendez, D., Sharav, J., Beno, I., Rosenthal, K., Resnick, M. A., & Haran, T. E. (2012). Low-level p53 expression changes transactivation rules and reveals superactivating sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14387–14392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205971109>

Kaesler, M. D., Pebernard, S., & Iggo, R. D. (2004). Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7598–7605. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311732200>

Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>

- Lain, S., & Lane, D. (2003). Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *European Journal of Cancer*, 39(8), 1053–1060. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00063-7)
- Lane, D. P. (1992). P53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), Article 6381. <https://doi.org/10.1038/358015a0>
- Lee, Y. R., & Park, S. Y. (2015). P53 expression in hepatocellular carcinoma: Influence on the radiotherapeutic response of the hepatocellular carcinoma. *Clinical and Molecular Hepatology*, 21(3), 230–231. <https://doi.org/10.3350/cmh.2015.21.3.230>
- Lees, A., McIntyre, A. J., Crawford, N. T., Falcone, F., McCann, C., Holohan, C., Quinn, G. P., Roberts, J. Z., Sessler, T., Gallagher, P. F., Gregg, G. M. A., McAllister, K., McLaughlin, K. M., Allen, W. L., Egan, L. J., Ryan, A. E., Labonte-Wilson, M. J., Dunne, P. D., Wappett, M., ... McDade, S. S. (2020). The pseudo-caspase FLIP(L) regulates cell fate following p53 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(30), 17808–17819. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001520117>
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.-C., & Kain, S. R. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 34970–34975. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34970>
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B., & Levine, A. J. (1994). Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes & Development*, 8(10), 1235–1246. <https://doi.org/10.1101/gad.8.10.1235>
- Linzer, D. I. H., & Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17(1), 43–52. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90293-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90293-9)
- Loew, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H., & Gossen, M. (2010). Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnology*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-81>

- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., & Jacks, T. (1993). P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, *362*(6423), Article 6423.
<https://doi.org/10.1038/362847a0>
- Maki, C. G. (1999). Oligomerization Is Required for p53 to be Efficiently Ubiquitinated by MDM2 *. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(23), 16531–16535. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16531>
- Osada, M., Park, H. L., Nagakawa, Y., Begum, S., Yamashita, K., Wu, G., Kim, M. S., Trink, B., & Sidransky, D. (2006). A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *339*(4), 1120–1128.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.118>
- Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., & Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, *312*(5995), Article 5995.
<https://doi.org/10.1038/312649a0>
- Pires, I., Ward, T., & Dive, C. (2010). Oxaliplatin responses in colorectal cancer cells are modulated by CHK2 kinase inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, *159*(6), 1326–1338.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00607.x>
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, *111*(2), 229–233.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-h)
- Ruaro, E. M., Collavin, L., Del Sal, G., Haffner, R., Oren, M., Levine, A. J., & Schneider, C. (1997). A proline-rich motif in p53 is required for transactivation- independent growth arrest as induced by Gas1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(9), 4675–4680.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4675>
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., & Prendergast, G. C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, *15*(8), Article 8.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201263>

- Shandilya, J., Wang, Y., & Roberts, S. G. E. (2012). TFIIB dephosphorylation links transcription inhibition with the p53-dependent DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(46), 18797–18802.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1207483109>
- Shen, H., Moran, D. M., & Maki, C. G. (2008). Transient Nutlin-3a treatment promotes endoreduplication and the generation of therapy-resistant tetraploid cells. *Cancer Research*, *68*(20), 8260–8268. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1901>
- Tanaka, T., Watanabe, M., & Yamashita, K. (2018). Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget*, *9*(22), 16234–16247. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24611>
- Toledo, F., Krummel, K. A., Lee, C. J., Liu, C.-W., Rodewald, L.-W., Tang, M., & Wahl, G. M. (2006). A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell*, *9*(4), 273–285.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.014>
- Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A., & Donehower, L. A. (2002). P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, *415*(6867), Article 6867. <https://doi.org/10.1038/415045a>
- Walker, K. K., & Levine, A. J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(26), 15335–15340. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15335>
- Zhang, W. W., Labrecque, S., Azoulay, E., Dudley, R., & Matlashewski, G. (2001). Development of a p53 responsive GFP reporter; identification of live cells with p53 activity. *Journal of Biotechnology*, *84*(1), 79–86. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00330-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00330-8)

