

GYMNÁZIUM BRNO-ŘEČKOVICE

ÚSTAV PATOLOGIE FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

TEPLOTNĚ DEPENDENTNÍ MUTACE NÁDOROVÉHO  
SUPRESORU P53

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST  
OBOR: 4. BIOLOGIE

AUTOR PRÁCE

MICHAELA KRÁKOROVÁ



GYMNÁZIUM BRNO-ŘEČKOVICE  
BRNO-ŘEČKOVICE GRAMMAR SCHOOL



ÚSTAV PATOLOGIE FAKULTNÍ  
NEMOCNICE BRNO  
DEPARTMENT OF PATHOLOGY AT THE  
UNIVERSITY HOSPITAL BRNO

TEPLOTNĚ DEPENDENTNÍ MUTACE NÁDOROVÉHO  
SUPRESORU P53  
TEMPERATURE-DEPENDENT MUTANTS OF TUMOR SUPPRESSOR P53

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST  
OBOR: 4. BIOLOGIE

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

MICHAELA KRÁKOROVÁ

EXTERNÍ KONZULTANT  
EXTERNAL CONSULTANT

prof. RNDr. JANA ŠMARDOVÁ, CSc.

ŠKOLNÍ KONZULTANT  
SCHOOL CONSULTANT

RNDr. KATEŘINA CIBULKOVÁ

BRNO 2013

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá charakterizací pěti teplotně dependentních mutací nádorového supresoru p53 zachycených v klinických vzorcích. Stanovení funkčních vlastností zahrnuje určení teplotní závislosti a diskriminativního charakteru v kvasinkových buňkách; dále je studována reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kancerogeneze, nádorový supresor, p53, teplotně dependentní mutace, amifostin

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis was to analyze five temperature-dependent mutants of the p53 tumor suppressor – to determine their temperature-dependent and discriminative character in yeast cells. In addition, reactivation of the mutant proteins in yeast cells was studied.

## **KEYWORDS**

cancerogenesis, tumor suppressor, p53, temperature-dependent mutants, amifostine

KRÁKOROVÁ, Michaela *Teplotně dependentní mutace nádorového supresoru p53*: středoškolská odborná činnost. Brno: Gymnázium Brno-Řečkovice. 53 s. Vedoucí práce byla prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou práci na téma „Teplotně dependentní mutace nádorového supresoru p53“ jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Jany Šmardové, CSc., a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené práce dále prohlašuji, že v souvislosti s jejím vytvořením jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

Brno .....

.....

(podpis autora)

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména vedoucí mé práce prof. RNDr. Janě Šmardové, CSc. za odborné vedení mé práce, za ochotu a čas, který mi věnovala nejen při zodpovídání nekonečného množství dotazů. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janě Jagošové a Mgr. Lence Pitrové za ochotnou pomoc v laboratoři a při zpracování výsledků. Děkuji i RNDr. Kateřině Cibulkové za věcné připomínky v průběhu mé práce. V neposlední řadě bych tímto ráda poděkovala svým rodičům za pochopení pro mé nadšení a za podporu, kterou mi poskytovali v průběhu celé práce, ačkoliv to pro ně nebylo vždy jednoduché.

# OBSAH

Úvod	8
Cíle práce	9
<b>1 Teorie</b>	<b>10</b>
1.1 Kancerogeneze . . . . .	10
1.1.1 Apoptóza . . . . .	11
1.2 Nádorový supresor p53 . . . . .	11
1.3 Struktura proteinu p53 . . . . .	12
1.4 Biologická funkce proteinu p53 . . . . .	13
1.5 Mutace genu <i>TP53</i> . . . . .	16
1.6 Teplotně dependentní mutace p53 . . . . .	17
1.7 Terapeutické využití obnovy funkce p53 . . . . .	17
1.7.1 Genová terapie . . . . .	18
1.7.2 Terapie pomocí virů . . . . .	18
1.7.3 Terapie pomocí siRNA . . . . .	19
1.7.4 Terapie malými molekulami . . . . .	19
1.8 Metody analýzy stavu p53 . . . . .	20
1.8.1 Metoda FASAY . . . . .	21
1.8.2 Původní varianta FASAY . . . . .	21
1.8.3 Gen <i>ADE2</i> ve FASAY . . . . .	23
1.8.4 Sekvenčně specifická FASAY . . . . .	23
<b>2 Materiál a metody</b>	<b>25</b>
2.1 Seznam chemikálií . . . . .	25
2.2 Biologický materiál a média . . . . .	25
2.3 Stanovení míry teplotní závislosti a diskriminativního charakteru p53	27
2.3.1 Transformace kvasinkových buněk . . . . .	27
2.3.2 Zamražení kvasinkových kolonií . . . . .	28
2.3.3 Příprava proteinového lyzátu z kvasinek . . . . .	28
2.3.4 Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové . . . . .	29
2.3.5 Elektroforetická separace proteinů pomocí SDS-PAGE . . . . .	29
2.3.6 Vizualizace separovaných proteinů . . . . .	30
2.3.7 Odečítání fenotypu kvasinkových kolonií . . . . .	30
2.4 Reaktivace mutovaných forem proteinu p53 pomocí amifostinu . . . . .	31

<b>3</b>	<b>Výsledky</b>	<b>32</b>
3.1	Stanovení funkčních vlastností td mutací p53 . . . . .	32
3.1.1	Stanovení míry teplotní závislosti mutací p53 . . . . .	32
3.1.2	Stanovení diskriminativního charakteru td mutací . . . . .	34
3.2	Studium reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Diskuze</b>	<b>39</b>
4.1	Teplotně dependentní charakter . . . . .	39
4.2	Diskriminativní charakter . . . . .	40
4.3	Reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu . . . . .	42
4.3.1	Stačí reaktivace jednoho proteinu k odstranění tumoru? . . . . .	43
	<b>Závěr</b>	<b>44</b>
	<b>Literatura</b>	<b>45</b>
	<b>Slovníček pojmů</b>	<b>51</b>
	<b>Seznam zkratk</b>	<b>52</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

1.1	Vizualizace tetrameru centrálních domén proteinu p53. . . . .	12
1.2	Role p53 při výběru buněčné odpovědi na různé typy buněčného stresu. . . . .	14
1.3	Volba mezi smrtí a přežitím. . . . .	15
1.4	Aktivace amifostinu v buňce . . . . .	20
1.5	Mechanismus obnovy funkce mutovaného proteinu p53. . . . .	20
1.6	Transformace kvasinkové buňky plazmidovou DNA. . . . .	22
1.7	Uspořádání experimentů pro FASAY. . . . .	24
3.1	Sedmistupňová škála barevných odstínů kvasinkových kolonií. . . . .	33
3.2	Ukázka fenotypového projevu ts a netypické mutace p53. . . . .	34
3.3	Pozitivní a negativní kontrola. . . . .	34
3.4	Stanovení diskriminativního charakteru. . . . .	35
3.5	Reaktivace mutovaných proteinů amifostinem. . . . .	38
4.1	Topologický diagram sekundární struktury p53c . . . . .	41



# ÚVOD

Nádorová onemocnění lidstvo provází již od dob pravěku, což dokazují mnohé archeologické nálezy. Antické Řecko zmiňuje první pokusy o jejich chirurgickou i medikamentózní léčbu, značnou pozornost jim věnovali zejména Hippokrates a Galén. Se systematictější zájmem o celkovou problematiku onkologických onemocnění a jejich léčbu se setkáváme až v 19. století. V prvopočátcích se jednalo pouze o léčbu chirurgickou, jejíž možnosti byly však značně omezeny; obrat přinesly až pozdější vědecké objevy. Nejdůležitější byl pravděpodobně objev léčebných účinků radia a rentgenových paprsků, který položil základy radioterapie. Zjištění, že cis-platina blokuje buněčné dělení, pak vedlo k vývoji prvních cytostatik. V posledních letech je zájem směřován také k tzv. biologické neboli cílené léčbě (target therapy). V současnosti probíhá terapie onkologických onemocnění na specializovaných pracovištích, ideálně v rámci multioborových týmů, a to z důvodu nutnosti komplexní léčby [1].

Trvale stoupající incidence onkologických onemocnění v čase je závažným celosvětovým problémem [1]. V současné době onemocní zhoubným nádorem každý 3. člověk, každý 4. člověk na jeho následky umírá. Současná úroveň medicíny dokáže vyléčit až 70 % dětí a adolescentů a asi polovinu onkologicky nemocných dospělých [2]. I přes neustále se rozšiřující možnosti léčby chirurgické, systémové léčby cytostatiky, hormonální manipulací či ozařováním zůstává mortalita maligních onemocnění vysoká (5. nejčastější příčina úmrtí [3]). Je tedy důležité se i nadále věnovat výzkumu těchto onemocnění, hledání příčin jejich vzniku a nových možností cílené léčby. Na nádory je v současnosti pohlíženo jako na onemocnění genetické, přičemž příslušné mutace mohou být buď vrozené, nebo somatické, vyvolané jak vnitřními, tak vnějšími faktory. K nejvíce studovaným patří mutace nádorového supresoru p53, které se vyskytují až u 50 % pacientů postižených nádorovým onemocněním [1].

Protein p53 hraje klíčovou roli v regulačních drahách organismu a jeho mutací bylo do současnosti popsáno téměř 30 000 [4]. Jednotlivé mutace jsou vysoce specifické, a tak každý takový genetický defekt unikátním způsobem narušuje normální fungování buňky. Systematický výzkum důsledků chování jednotlivých mutovaných proteinů vytváří základní stavební kameny pro vývoj cílené, a tedy i efektivnější protinádorové terapie.

V lékařské praxi se setkáváme se situacemi, kde jsou možnosti konvenční léčby cytostatiky a/nebo zářením omezené pro nedostatečnou léčebnou odpověď či nadměrnou toxicitu. Častý je též problém vzniku primární či sekundární rezistence na tuto léčbu. Snaha o obnovení normálních autoregulačních funkcí maligně transformované buňky se v těchto případech jeví logickou cestou dalšího vývoje léčebných možností, který by ve svém konečném důsledku mohl znamenat ústup od standardních metod současné onkologické léčby. Z tohoto důvodu je v takovém způsobu léčby do budoucna spatřován významný potenciál.

## CÍLE PRÁCE

Cílem práce byla analýza transaktivačních schopností pěti teplotně dependentních (td) mutací proteinu p53 detekovaných v klinických vzorcích pomocí metody FASAY: P152L, T155I, R158H, E171G a T211N. Úkoly byly následující:

- analýza teplotní závislosti td mutantů p53 vzhledem k responzivnímu elementu RGC;
- analýza diskriminativního charakteru td mutantů p53, tj. změna transaktivačních schopností vzhledem k responzivním elementům *p21* a *bax* v teplotách 25 °C, 30 °C a 35 °C;
- reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu.

# 1 TEORIE

## 1.1 Kancerogeneze

Nádorové onemocnění je možné charakterizovat jako nekontrolovaný nárůst buněk (neoplázie) s poruchami regulačních mechanismů a buněčné diferenciace. Takový nárůst „nefunkčních“ buněk vede ke zbytnění postižené tkáně a k útlaku či k invazi do okolních struktur s možností metastazování do vzdálenějších lokalit. Kancerogeneze je proces ovlivněný jak vnitřními, tak vnějšími faktory, který vede přes sérii premaligních změn až ke vzniku invazivního tumoru. Kancerogenetické faktory mohou být různé povahy: fyzikální (ionizující a UV záření, elektromagnetické pole), chemické (těžké kovy, aromatické aminy, alkylační látky, steroidní hormony) a biologické (bakterie, RNA a DNA viry). Působením kancerogenů vznikají genetické změny (Mohou však být i vrozené.), které vedou k aktivaci onkogenů<sup>1</sup> a inaktivaci nádorových supresorů<sup>2</sup> [1, 5]. Jediná mutace však k maligní transformaci buňky zpravidla nestačí; výsledky epidemiologických studií odhadují, že k plnému rozvoji maligního fenotypu je nezbytná akumulace 4 až 8 různých genetických a epigenetických změn [6].

Nádorové supresory hrají důležitou roli v obraně proti přenosu poškození DNA při replikaci. V případě poškození buňky nějakou formou stresu dojde k aktivaci těchto proteinů a k následným zásahům do života buňky. V závislosti na aktuálním fyziologickém stavu buňky pak dochází k zastavení buněčného cyklu následovanému opravou poškozené DNA, nebo k indukci apoptózy, tedy řízené buněčné smrti [7, 8].

Pokud jsou tyto procesy nějakým způsobem defektní, dochází ke ztrátě kontroly nad buňkou a ke vzniku nádorového bujení. Důsledkem toho získává maligní tkáň vlastnosti rozdílné od tkáně zdravé. Nádorová buňka si sama generuje růstové signály a naopak je insenzitivní vůči růstovým inhibitorům; získává také neomezený replikační potenciál. Důležitým krokem ve vývoji nádoru je indukce angiogeneze<sup>3</sup>, která ve zdravé tkáni podléhá přísné regulaci. U většiny malignit dříve nebo později dochází k invazi do okolních tkání a k metastazování. Tímto procesem se nádorové buňky šíří krevním řečištěm do blízkých i vzdálených tkání, kde je prostor či výživa zpočátku nelimitují v dalším růstu. Metastázy jsou příčinou až 90 % úmrtí na malignity. V neposlední řadě pak nádorová buňka ztrácí schopnost diferenciace a apoptózy [5, 9].

---

<sup>1</sup>**Onkogen** je gen, který způsobuje transformaci zdravé buňky v nádorovou. Vzniká patologickou změnou normálních genů řídících buněčný růst a diferenciaci.

<sup>2</sup>**Nádorový supresor** je gen, který omezuje buněčnou transformaci (Potlačuje vznik nádoru.)

<sup>3</sup>**Angiogeneze** je proces rozvoje nové krevní sítě ve tkáni (také neovaskularizace).

### 1.1.1 Apoptóza

Indukce apoptózy je základní funkcí nádorového supresoru p53 a nejkrajnějším případem buněčné odpovědi na vnější i vnitřní stres. Jedná se o evolučně konstantní proces, kterým organismus odstraňuje poškozené nebo nežádoucí buňky. Nejdůležitějšími cílovými geny p53 v souvislosti s apoptózou jsou geny *bax* a *PUMA* [10, 11].

Apoptotické signály mohou být vedeny po dvou drahách. Vnější apoptotická dráha je spouštěna aktivací receptorů buněčné membrány (tzv. receptorů smrti), aktivací vnitřní apoptotické dráhy indukují stresové signály. Protein p53 je důležitým účastníkem obou těchto signálních drah, dominantně však ovlivňuje vnitřní apoptotickou dráhu. Aktivace této dráhy vede ke změně potenciálu na vnitřní membráně mitochondrií způsobující uvolnění cytochromu c do cytoplasmy, které spouští kaskádu procesů vedoucích k buněčné smrti [10, 12].

## 1.2 Nádorový supresor p53

Gen *TP53*, lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromozomu, složený z 11 exonů<sup>4</sup>, je v současné době nejvíce studovaným nádorovým supresorem. Mutace tohoto genu kódujícího protein p53 se vyskytují u 50 % pacientů postižených onkologickým onemocněním; dosud bylo popsáno více než 29 500 různých mutací genu *TP53* [4]. Částečná nebo úplná dysfunkce proteinu p53 však může být ovlivněna i poruchou některé z jeho signálních drah. Inaktivace proteinu p53 je často způsobena nadměrnou degradací zprostředkovanou proteinem MDM2 nebo jeho vazbou s různými proteiny, které mohou být i virového původu [13].

Správná funkce tohoto proteinu je pro buňku důležitá zejména z důvodu široké oblasti jeho působení. Jedná se o důležitý transkripční faktor<sup>5</sup> indukující expresi několika desítek svých cílových genů (Do současné doby jich bylo popsáno téměř 100.), se kterými tvoří vysoce komplexní síť. Jeho aktivita se tedy promítá do řady buněčných pochodů [11, 14].

Při poškození DNA se zvyšuje hladina tohoto proteinu, důsledkem čehož dojde k zastavení buněčného cyklu ve fázi G<sub>1</sub><sup>6</sup>. Poté dochází k reparaci poškozené části DNA nebo k indukci řízené buněčné smrti v závislosti na fyziologickém stavu, ve kterém se buňka nachází. Díky tomu udržuje protein p53 genetickou stabilitu, a je tak někdy označován jako „strážce genomu“ [13].

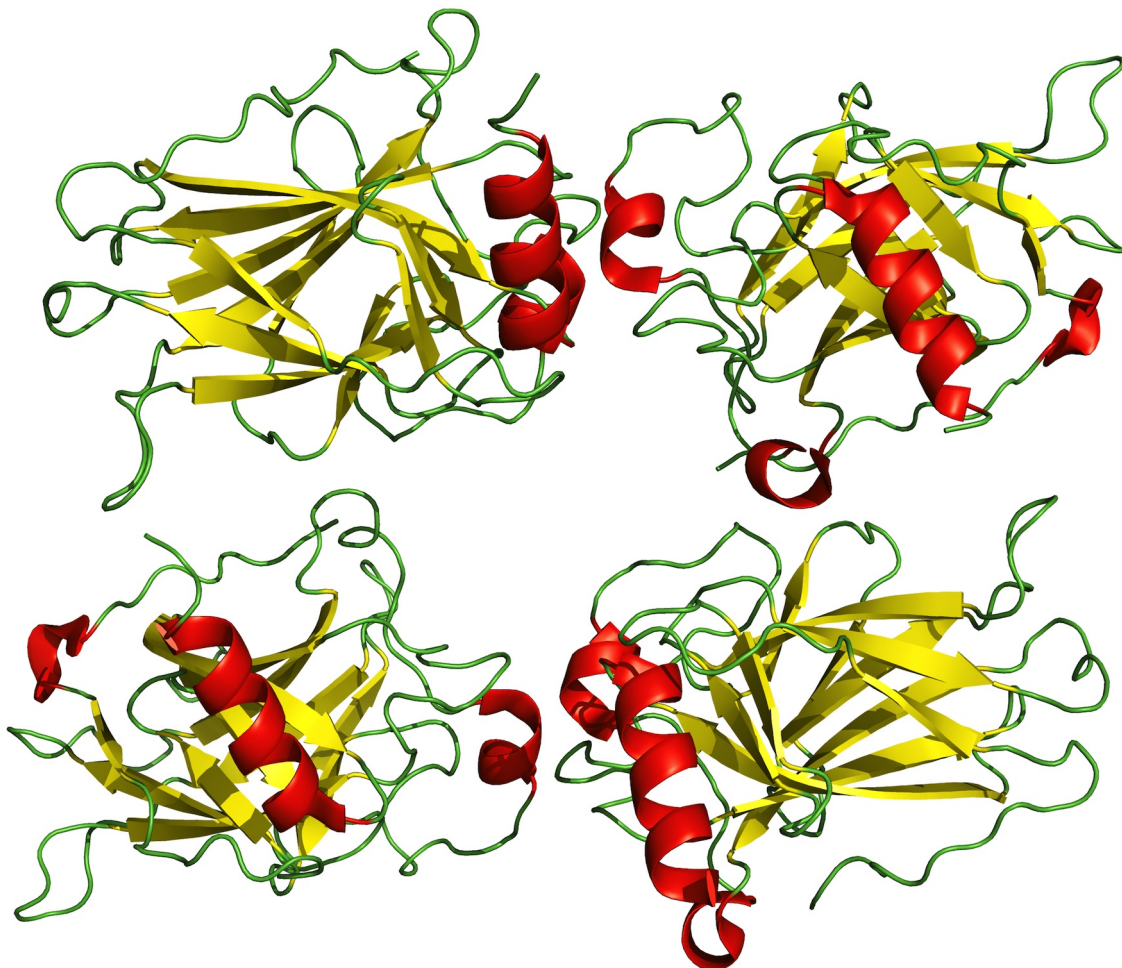
Protein p53 se ve formě tetrameru váže na specifické sekvence DNA v promotorových oblastech svých cílových genů [11]. Produkty těchto genů zasahují do mnoha

<sup>4</sup>**Exon** je kódující oblast genu.

<sup>5</sup>**Transkripční faktor** je protein se schopností iniciovat transkripci specifických genů.

<sup>6</sup>**Fáze G<sub>1</sub> buněčného cyklu** je fáze, během které buňka roste a kontroluje svůj stav před replikací DNA.

buněčných funkcí souvisejících s nádorovou transformací. Vzhledem k tomu se dá inaktivace proteinu p53 považovat za téměř univerzální součást vývoje nádorových onemocnění [15]. U zdravých buněk je jeho hladina udržována na nízké úrovni díky jeho rychlé degradaci [16].



Obr. 1.1: Vizualizace tetrameru centrálních domén proteinu p53. Struktura převzata z Kitayner et al. [17].

### 1.3 Struktura proteinu p53

Monomerní jednotka proteinu p53 je tvořena 393 aminokyselinami. Základ její struktury tvoří 3 domény: N-koncová, centrální a C-koncová doména. N-koncová doména zprostředkovává interakce s proteiny, které ovlivňují funkci p53 (tzv. transaktivační doména).

Centrální doména zajišťuje specifickou vazbu proteinu p53 na DNA na konsensus<sup>7</sup> sekvenci RRRCWWGYYY (R = purinová báze, Y = pyrimidinová báze,

<sup>7</sup>**Konsensus sekvence** je obecná sekvence, na kterou je p53 schopen se navázat (dvě sekvence deseti nukleotidů oddělených spacerem 0–13 bází, nejčastěji 0–3 [18]).

W = adenin/thymin)<sup>8</sup> [19, 20]. Na sekvenci bází také nejspíše závisí afinita p53 k různým responzivním elementům<sup>9</sup>; až 95 % přirozených responzivních elementů se však s touto sekvencí neshoduje plně [18].

C-koncová oblast se pak skládá z negativně autoregulační domény a tetramerizační domény, která zprostředkovává oligomerizaci proteinu p53. Autoregulační doména nespecificky váže DNA, čímž protein allostericky inhibuje [21]. Z toho vyplývá, že mutace na této doméně jsou často tzv. superaktivní, na rozdíl od mutací na DNA-vazebné doméně, zvyšují transaktivační schopnosti a celkovou stabilitu proteinu.

C- a N-koncové oblasti zaujímají přirozeně nesloženou strukturu, což umožňuje interakci s mnoha p53-regulujícími proteiny. Centrální oblast vykazuje statickou konformaci, udržovanou řadou vnitřních interakcí. Tato oblast je tvořena ze dvou  $\beta$ -listů složených do  $\beta$ -sendviče, který zprostředkovává vazbu na DNA. Důležitou součástí centrální domény je atom zinku, jehož odstranění by mělo na protein destabilizační účinky a znemožnilo by vazbu na DNA.

Protein p53 se na DNA váže v podobě tetrameru složeného ze dvou identických dimerů provázaných protein-proteinovými vazbami [22]. Stabilita těchto interakcí je udržována vodíkovými můstky, polárními vazbami a hydrofobními interakcemi. Celková stabilita proteinu p53 závisí zejména na stabilitě centrální domény, která je při 37 °C nízká, doména tak může svoji konformaci rozvolnit. V důsledku této nestability je citlivá vůči mutacím [23].

## 1.4 Biologická funkce proteinu p53

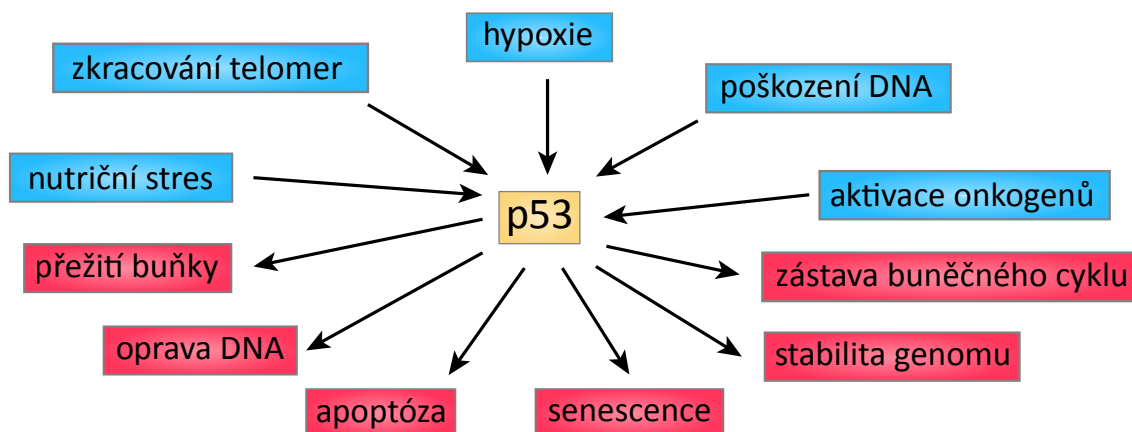
Aktivace proteinu p53 nastává jako odpověď na vnitřní a vnější stresové signály; v buňce se nenachází žádná alternativní dráha, která by zastoupila signální dráhu p53 v případě jejího vyřazení z funkce. Toto opět dokládá klíčový význam proteinu p53 v organismu.

Signály vedoucí k aktivaci p53 jsou rozmanité. Jedná se například o přímé poškození DNA, hypoxii, kritické zkrácení telomer nebo nadměrnou aktivaci některých onkogenů. Jako odpověď na tyto signály dochází k rozsáhlým modifikacím proteinu p53, jejichž plný význam zatím nebyl zcela objasněn. Jedním z vysvětlení je, že charakter těchto modifikací určuje indukci transkripce specifických genů v závislosti na povaze stresové situace v buňce [10].

Za standardních podmínek je protein p53 neustále degradován, a není proto v tkáních většinou detekovatelný. Poločas jeho rozpadu (6–20 minut) se může však

<sup>8</sup>Bylo zjištěno, že kombinace AT na místě v sekvenci označeném „WW“ je asociována s vyšší aktivitou p53, AA a TT vedou ke snížení aktivity a TA aktivitu p53 zcela inhibuje.

<sup>9</sup>Nejsilnější afinita byla sledována u sekvence CATG na místě čtyř prostředních nukleotidů.



Obr. 1.2: Role p53 při výběru buněčné odpovědi (modré rámečky) na různé typy buněčného stresu (červené rámečky). (Převzato a upraveno z Vousden – Lane [10].)

prodloužit v případě, že je buňka nějakým způsobem vykloněna z rovnováhy. Protein p53 pak zasahuje a jeho akumulace může být detekována i ve zdravé tkáni [24]. Degradace p53 je zprostředkována především proteinem MDM2, který s proteinem p53 tvoří zpětnovazebnou kličku: p53 reguluje transkripci genu *MDM2* a protein MDM2 zajišťuje degradaci p53, a tedy blokuje jeho aktivitu. Mutované formy p53 se často vyznačují delším poločasem rozpadu a jejich akumulací v buňkách, která je nejčastěji zapříčiněna neschopností mutovaných forem proteinu p53 indukovat transkripci genu *MDM2* [25].

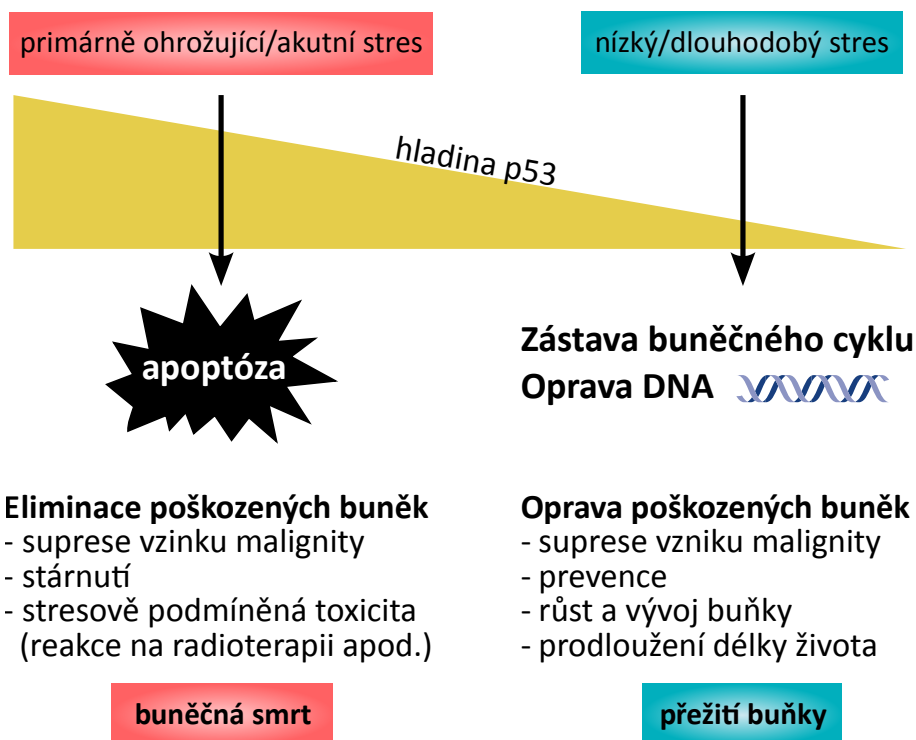
Po aktivaci se protein p53 váže na tzv. p53 responzivní elementy a indukuje transkripci několika desítek cílových genů, z nichž většina ovlivňuje buněčné pochody. Jsou to např. geny opravy DNA (*p48*), regulace buněčného cyklu (*p21*), apoptózy (*bax*, *PUMA*) nebo prevence vzniku poškození DNA kyslíkovými radikály (*sestrin*). Byla popsána řada dalších cílových genů. Jedná se např. o geny ovlivňující regulaci glykolýzy, remodelaci kostí nebo buněčnou diferenciaci a senescenci<sup>10</sup>. Kromě indukčních vlastností je protein p53 schopen také inhibice některých svých cílových genů. Tyto procesy však zatím nebyly detailně popsány [26, 27].

Charakter buněčné odpovědi závisí na průběhu celé signální dráhy proteinu p53, odvíjí se od aktuálního fyziologického stavu buňky a závisí na řadě faktorů (buněčný typ, povaha stresové situace v buňce, fyziologický stav buňky, stav proteinu p53 aj.). Podle charakteru buněčného stresu dochází ke specifické modifikaci proteinu p53, což ovlivňuje výběr cílových genů (obr. 1.2).

Nejdůležitější konečné články této dráhy jsou apoptóza a zástava buněčného cyklu. Volba mezi těmito dvěma mechanismy závisí na rozsahu poškození. Pokud

<sup>10</sup>**Buněčná senescence** je proces biologického stárnutí buňky.

je poškození většího rozsahu, je zahájena programovaná buněčná smrt. Pokud se jedná o poškození mírnější, buněčný cyklus je zastaven, a vzniká tak prostor pro mechanismy reparace (obr. 1.3). Zvýšená hladina proteinu p53 vyvolaná akutním stresem však může způsobit řadu vedlejších účinků jako předčasné stárnutí či toxicitu onkologické léčby.



Obr. 1.3: Volba mezi smrtí a přežitím. (Převzato a upraveno z Vousden – Lane [10].)

Některé studie (Soussi [28]) polemizují o charakteru proteinu p53. Standardní protein p53 plní funkci nádorového supresoru, zatímco velká část jeho mutací vykazuje chování onkogenů. Byla popsána kooperace p53 s homologními proteiny<sup>11</sup> p63 a p73, které jsou schopny tvořit různé izoformy, z nichž některé mají funkci analogickou k p53 (schopnost indukovat apoptózu a zástavu buněčného cyklu), a další mají účinek zcela opačný [28, 29]. Předpokládá se, že tyto proteiny tvoří dohromady komplexní síť, která reguluje pochody v celém organismu [28]. Některé mutované formy p53 (narozdíl od jeho standardní formy) jsou schopny silné vazby k těmto proteinům (tvoří heterooligomery) a vyřazují je tak z funkce. I tato skutečnost přispívá ke kontroverzím kolem proteinu p53 a jeho role v maligní transformaci [29]. Nedávno bylo navíc zjištěno, že i p53 se může vyskytovat v různých izoformách, což může být zajímavým předmětem budoucích studií [30].

<sup>11</sup>**Homologní proteiny** jsou proteiny mající vysoký stupeň homologie na úrovni sekvence nukleotidů nebo aminokyselin. Často tvoří tzv. proteinové rodiny, některé funkce mají podobné.



## 1.5 Mutace genu *TP53*

Většina nádorových supresorů je inaktivována takovou mutací, která zapříčiňuje úplnou ztrátu proteinu, nebo jeho syntézu v nekompletní podobě. Mutace *TP53* mají ale poněkud jiný charakter. K inaktivaci p53 dochází v převážné většině případů (87,2 %) bodovou mutací v kódující sekvenci. Jejím následkem dojde k záměně „pouhého“ jednoho nukleotidu a následně jedné aminokyseliny, ale tím k částečné nebo úplné ztrátě funkce výsledného proteinu. Mutace mohou měnit aminokyselinu přímo zprostředovávající vazbu na DNA, ale také konformaci celého proteinu. Až 90 % mutací se nachází v centrální doméně pro vazbu DNA a jejich důsledkem je neschopnost proteinu p53 vázat se na cílové sekvence [20, 22, 29].

Frekvence výskytu somatických mutací genu *TP53* se liší zejména v závislosti na typu nádoru. Například u karcinomu plic a tlustého střeva je to 60–65 %, u nádorů žaludku 40–45 %, u leukémií pouze 10–15 % [16]; některé konkrétní mutace p53 jsou navíc tkáňově specifické [31]. Mezi jednotlivými mutacemi p53 byla pozorována značná strukturní, biologická i biochemická variabilita, proto se *TP53* často označuje jako „master gene of diversity“ [20, 27]. Existují mutace, které se vyskytují s vyšší frekvencí než jiné (Hovoříme o nich jako o tzv. hot-spot mutacích.); takovou mutací jsou například substituce argininu na pozicích 175, 243, 273 a 282, které tvoří až 20 % všech mutací [15].

Původně bylo na mutace proteinu p53 nahlíženo jako na „klasické“ zcela inaktivující mutace. V dnešní době se ale výzkumem rozmanitých funkčních důsledků mutací tohoto proteinu snažíme pochopit jeho úlohu v lidském organismu. Takto byl popsán např. dominantně negativní efekt, kdy mutantní proteiny tvoří částečně nebo zcela inaktivní heterotetramery s funkčními proteiny (produkty standardní alely), a vyřazují tak zdravou alelu z funkce. Další skupinou jsou tzv. „gain-of-function“ mutace p53, tedy proteiny se získáním další funkce (schopnost působit na další geny, proteiny nebo procesy v buňce), které přispívají k maligní transformaci (u takto mutovaných proteinů byla navíc zjištěna spojitost s předčasným stárnutím organismu) [19, 24]. Zvláštností jsou výše zmíněné superaktivní mutace. Samostatnou skupinu pak představují teplotně dependentní (td) mutace [16].

Na důsledky mutací lze tedy pohlížet ve dvou rovinách. Mutace může ovlivňovat jednak přímo funkci p53 (dominantní/recesivní mutace, projev dominantně negativního efektu), a také jeho transkripční schopnosti (inaktivace, schopnost indukovat apoptózu a zástavu buněčného cyklu, změna diskriminativity, teplotní závislosti). Podle struktury lze mutace rozdělit na kontaktní, kdy je zaměněna aminokyselina přímo interagující s DNA, a strukturní, kdy záměna aminokyseliny mění celkovou konformaci proteinu [26, 32].

Oddělenou skupinu malignit s narušením funkce p53 pak tvoří tumory, které neobsahují mutaci v genu *TP53*, ale mají vysokou hladinu proteinu MDM2, který způsobuje neúměrně rychlou degradaci p53, a tím jeho inaktivaci [25, 27]. Stejný efekt pak může mít vazba standardního proteinu p53 s virovými proteiny (např. virový protein E6 lidského papilomaviru způsobujícího karcinom děložního čípku).

p53 deficientní buňky jsou odolnější vůči např. radiaci, nadměrné aktivaci onkogenů nebo hypoxii, což jsou časté vlastnosti nádorových tkání [11]. Řada studií zkoumala prognostický význam přítomnosti mutace proteinu p53. O jejich výsledcích se dlouho spekulovalo, rozsáhlé výzkumy však prognostickou hodnotu p53 potvrdily. Mutace p53 jsou asociovány s nedostatečnou odpovědí na chemoterapii, kratším přežíváním pacientů a metastazováním [33–35].

## 1.6 Teplotně dependentní mutace p53

Teplotně dependentní (td) mutace proteinu p53 patří do skupiny částečně inaktivujících a tvoří až 10 % všech mutací. Takto mutované proteiny nejsou schopny vazby na DNA za fyziologických podmínek, za podmínek subfyziologických (v tomto případě se jedná o změnu teploty) však dochází k obnově schopností vazby k DNA. Většina td mutací proteinu p53 se nachází v centrálním  $\beta$ -sendviči a jedná se především o záměnu hydrofobních aminokyselin. Tyto aminokyseliny jsou důležité pro správné sbalování proteinu, a tedy pro jeho stabilitu.

Řada teplotně dependentních mutací vykazuje také tzv. diskriminativní charakter. To znamená, že jejich aktivita k některým cílovým genům je zachována, zatímco aktivita k jiným je částečně nebo zcela ztracena [36, 37]. V řadě případů lze však proteinu postiženému teplotně dependentní mutací nastolit podmínky vhodné pro znovuoobnovení jeho funkce. Tyto podmínky se však mohou značně lišit v závislosti na závažnosti funkčního postižení mutovaného proteinu [38, 39].

Teplotně dependentní mutace mohou být buď teplotně, nebo chladově senzitivní. V případě teplotně senzitivních (ts) mutací aktivita p53 s rostoucí teplotou klesá, v případě chladově senzitivních (cs) je tomu naopak.

## 1.7 Terapeutické využití obnovy funkce p53

Léčba konvenční chemoterapií a radioterapií spouští v buňkách procesy vedoucí k apoptóze, čímž dochází k odstranění maligních buněk. Nádory obsahující nefunkční protein p53 jsou však často k těmto procesům rezistentní. Proto se protein p53 stal předmětem řady studií, které si kladou za cíl najít prostředky ke znovuoobnovení jeho funkce.

Obnova funkce proteinu p53 aktivuje totiž i jeho následné dráhy u různých typů malignit. Předpokládá se, že v maligních buňkách jsou neustále přítomny signály vedoucí k aktivaci p53. Většina typů nádorů má sice nefunkční protein p53, jeho následné signální dráhy však zůstávají nezměněny. Reaktivace proteinu p53 se proto jeví jako budoucnost v protinádorové terapii, jelikož možnosti cytostatik jsou vyčerpatelné a mnoho nádorů je v současné době chemo- či radio-rezistentní. Navíc bylo zjištěno, že strukturní změny většiny mutantních forem proteinu p53 jsou reverzibilní, je tedy nějakým způsobem možné je uvést do správného konformačního stavu [15].

Cílem všech strategií je selektivně obnovit standardní funkci p53 v maligně transformovaných buňkách, zatímco jeho funkce v buňkách nenádorových zůstane nezměněna. Při terapii cílené na obnovu funkce proteinu p53 je důležité vědět, jakým způsobem k inaktivaci došlo: zda se jedná o poškození přímo proteinu p53, či je narušena některá z jeho signálních drah [40–42].

### 1.7.1 Genová terapie

První snahy o vnesení funkčního genu *TP53* do maligně transformovaných buněk se objevily kolem roku 1990. Cílem genové terapie je zastavení buněčného růstu a vyvolání apoptózy v důsledku přítomnosti funkčního proteinu p53. Odpověď lidských maligních buněk na transfekci<sup>12</sup> genem *TP53* je různá a liší se v závislosti na typu malignity. V roce 2003 došlo k oficiálnímu schválení přípravku Gendicin, který obsahuje adenovirový vektor se sekvencí *TP53* [43, 44]. Problémem této terapie je však snižování její účinnosti přirozenou reakcí imunitního systému na přítomnost adenovirových fragmentů. Proto se vývoj této strategie nyní soustředí na hledání stabilnějších vektorů použitelných pro genovou terapii [44–46]. V druhé fázi preklinických testů se v současné době nachází přípravek Advexin [47].

### 1.7.2 Terapie pomocí virů

Virus, který by byl schopen rychlého selektivního množení pouze v maligních buňkách, je revoluční myšlenkou a představuje způsob překonání řady problémů genové terapie. Jedním takto upraveným virem je adenovirus ONYX-015 s deletovanou oblastí E1B. Protein E1B-55kDa kódovaný tímto genem se váže na p53, a zabraňuje tak jeho správné funkci. Další virový protein E1A pak buňku donutí přejít do S fáze buněčného cyklu a umožní tak replikaci viru [48]. V případě delece této oblasti není

---

<sup>12</sup>**Transfekce** je proces přenosu genetického materiálu do eukaryotní buňky.

virus schopen replikace ve zdravých buňkách s funkčním proteinem p53. Buňky s mutací genu *TP53* jsou na přítomnost tohoto viru naopak citlivé. Virus ONYX-015 je v těchto buňkách schopen rychlé replikace s následkem buněčné lyze [26].

Terapie založené na bázi kombinace tohoto viru, cis-platiny a dalších cytostatik jsou v současnosti ve druhé a třetí fázi klinických testů a vykazují poměrně dobré výsledky [49]. V Číně byla po ukončení klinických testů v roce 2005 schválena kombinace adenoviru H101 (podobný ONYXu-015, taktéž s delecí oblasti E1B), cis-platiny a 5-fluorouracilu jako terapie pro nádory hlavy a krku [48, 50]. Je však nutno dodat, že úspěšnost terapií založených na ONYXu-015 nedosahují očekávání z preklinických testů na zvířecích modelech a stále naráží na překážky, které je nutno překonat. Procesům, kterými ONYX-015 selektuje maligní buňky, aby se v nich mohl reprodukovat, nebylo dosud zcela porozuměno a některé studie (Edwards et al. [51]) prohlašují, že stav p53 v buňkách není určujícím faktorem [52].

### 1.7.3 Terapie pomocí siRNA

V případě heterozygotní mutace je slibným přístupem využití molekuly siRNA<sup>13</sup>, která cíleně sníží nebo zcela eliminuje expresi mutantní alely, zatímco expresi zdravé alely nijak neovlivní. Tato metoda je vysoce selektivní a zatím poměrně úspěšná [53]. Aplikaci siRNA je možné použít i v případě inaktivity p53 způsobené zvýšenou expresí p53-negativně regulujících proteinů, kdy je exprese jejich genů regulována RNA interferencí. Při tomto jevu se krátké dvouřetězcové úseky RNA (siRNA) tvoří komplementárně k mRNA, na kterou se naváží a inhibují tak transkripci genu.

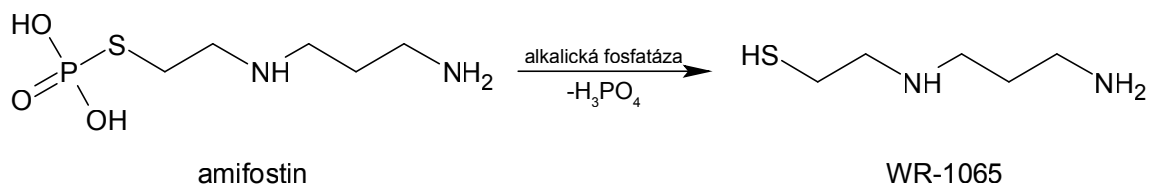
### 1.7.4 Terapie malými molekulami

Protein p53 inaktivovaný v důsledku bodové mutace v kódující sekvenci je vhodný pro terapii tzv. malými molekulami (amifostin, CDB3, PRIMA), které jsou schopny jej uvést do správného konformačního stavu, a obnovit tak jeho standardní funkci (obr. 1.5). Tato terapie je vysoce specifická. Je cíleně zaměřena na proteiny s pozměněnou primární strukturou, proteiny v nenádorových buňkách tedy nijak neovlivní. Navíc, hladina proteinu p53 je v maligně transformovaných buňkách silně zvýšena oproti buňkám zdravým [15, 26].

WR-1065 je označení aktivní formy amifostinu (obr. 1.4), který byl objeven jako vysoce radioprotektivní látka s nízkou toxicitou. Prostřednictvím své –SH skupiny je schopen vychytávat volné radikály vznikající působením chemoterapeutik. Volné

---

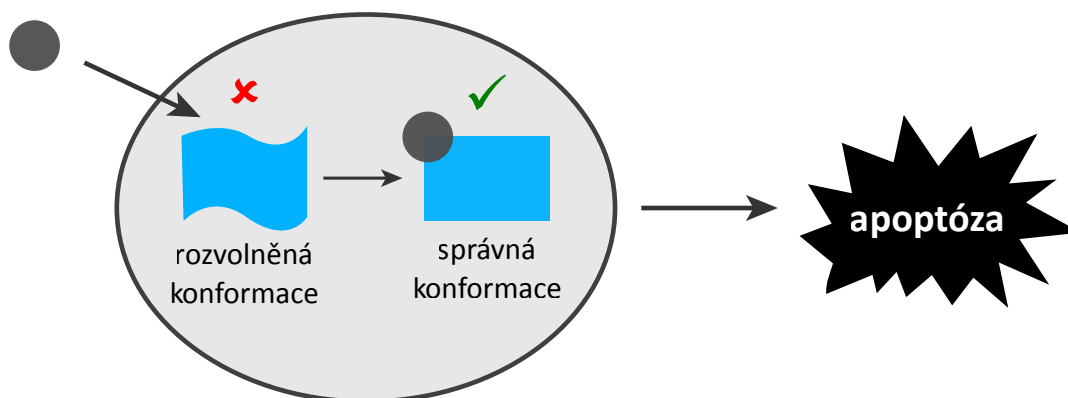
<sup>13</sup>**SiRNA** (small interfering RNA) jsou molekuly RNA o délce 20–25 nukleotidů, které se uplatňují při RNA interferenci (Jev, kdy RNA ovlivňuje míru transkripce určitého genu.)



Obr. 1.4: Hydrolýza amifostinu ve zdravé buňce na aktivní cytoprotektivní metabolit (převzato a upraveno z databáze PubChem [54, 55]).

-SH skupiny modifikují na molekule p53 zbytky cysteinu, což vede ke zvýšení schopnosti p53 k vazbě na DNA, do promotorových oblastí některých cílových genů. Amifostin působí kromě standardního proteinu p53 i na jeho mutované formy, z nichž část tvoří právě teplotně dependentní mutace. V práci Grochová – Šmardová [56] byla sledována reaktivace proteinu p53 po expozici amifostinem u souboru 23 teplotně dependentních mutací [14, 56].

malá molekula



Obr. 1.5: Předpokládaný mechanismus obnovy funkce mutovaného proteinu p53 pomocí malých molekul. Po navázání malé molekuly se mutovaný protein složí do správné konformace a obnoví svou funkci, čímž indukuje masivní apoptózu a odstranění nádorové buňky. Podobně mohou malé molekuly také přerušit vazbu mutantního proteinu p53 s jeho homologem p73, a vrátit tak funkci i proteinu p73. (Převzato a upraveno ze Selivanova et. al 2007 [15].)

Další nadějí je švédský přípravek PRIMA, který je v současnosti ve druhé fázi preklinických testů [47].

## 1.8 Metody analýzy stavu p53

K určení statutu proteinu p53 v biologickém materiálu slouží řada metod. K nejdostupnějším patří metody imunohistochemické, kdy je protein p53 detekován pomocí specifické protilátky. Zvýšená hladina proteinu p53 v maligně transformovaných buňkách oproti buňkám zdravým byla poprvé zjištěna v roce 1982. V dnešní době již

víme, že mutantní protein p53 podléhá pomalejší degradaci z důvodu chyby ve zpětnovazebné kličce p53-MDM2, a dochází tak k jeho akumulaci ve tkáních. Výskyt mutace však ne vždy musí znamenat akumulaci, a tedy zvýšenou hladinu p53. Například mutace vedoucí k úplné ztrátě proteinu p53 nebo mutace měnící vazebné místo pro danou protilátku nelze imunohistochemicky detekovat [16].

Další možností je využití molekulárních analýz, pomocí kterých se detekují změny v sekvenci DNA genu *TP53*. Nejvýznamnější metodou je zde sekvenování DNA, které umožňuje přesně detekovat mutaci v genu *TP53*, její nevýhodou je však nízká citlivost a naopak vysoká technická náročnost. Změnu struktury DNA mohou způsobit také tiché mutace<sup>14</sup>, které aktivitu proteinu p53 nemění, a mohou tak vést k falešně pozitivním výsledkům.

Další skupinu metod představují funkční analýzy. Ty umožňují přímo stanovit biologickou funkci proteinu p53, zejména jeho schopnost indukovat apoptózu a blokovat růst transformovaných buněk. Nejčastěji se však využívá stanovení míry transaktivačních schopností p53. Klasické transaktivační testy zahrnují klonování genu *TP53* do vektoru a transformaci<sup>15</sup> buněk tento gen neobsahujících ( $p53^{-/-}$ ). Zároveň je do buněk vpraven plazmid<sup>16</sup> s reportéřským genem. Funkčnost proteinu p53 je pak stanovena na základě míry exprese reportéřského genu. Nevýhodou těchto metod je pracnost a časová náročnost. Metoda FASAY však tyto nedostatky odstraňuje [13, 26].

### 1.8.1 Metoda FASAY

Jedním z funkčních testů je metoda FASAY (*Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast*). Tato metoda umožňuje určení míry transaktivačních schopností proteinu p53 prostřednictvím speciálně upraveného kmene kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (yIG397). FASAY je jednoduchá, citlivá a vysoce specifická metoda. Navíc má tato metoda velký potenciál, neboť může být dále zdokonalována a obměňována dle potřeb sledovat další parametry mutací p53. Jako jediná z metod je také schopna přímo rozlišit typy mutací proteinu p53 dle funkce [16, 57, 58].

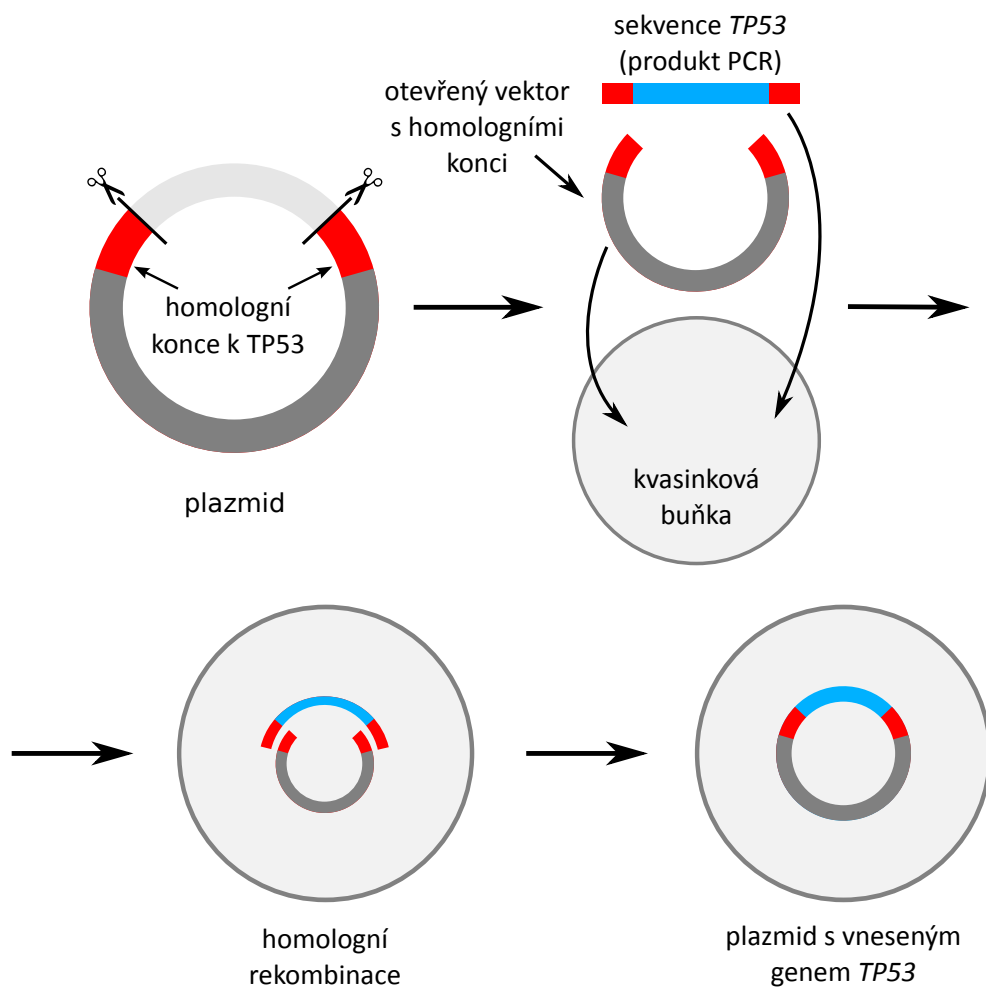
### 1.8.2 Původní varianta FASAY

Prvním krokem je izolace RNA ze vzorku tkáně nebo krve, načež je reverzní transkripcí získána cDNA (komplementární DNA obsahující pouze exony daného genu). Poté je centrální část genu *TP53* amplifikována metodou PCR (polymerase chain reaction). Následně probíhá transformace kvasinkového kmene yIG397 produktem

<sup>14</sup>**Tichá mutace** je substituce bází v tripletu, která nemění aminokyselinu ve výsledném proteinu.

<sup>15</sup>**Buněčná transformace** je proces umělého vnesení cizorodé DNA do buňky. U eukaryotních organismů se tento proces častěji nazývá transfekce.

<sup>16</sup>**Plazmid** je kruhová DNA.



Obr. 1.6: Transformace kvasinkové buňky plazmidovou DNA. Z bakteriálního plazmidu je vystřižena sekvence tak, aby konce vzniklého otevřeného vektoru byly homologní k sekvenci genu *TP53*. Takto připravený otevřený vektor je spolu s amplifikovanou sekvencí genu *TP53* vnesen do kvasinkové buňky, která svými enzymy provede homologní rekombinaci, a včlení tak *TP53* do plazmidu. Pokud byla transformace úspěšná, je zahájena transkripce *TP53*, a tedy exprese proteinu p53.

PCR a otevřeným vektorem, jenž nese konce genu *TP53* a gen *LEU2* pro syntézu leucinu, který zde plní funkci selekčního markeru. Kmen yIG397 obsahuje mutace genů pro syntézu histidinu (*HIS3*) a leucinu (*LEU2*) a reportérský gen *HIS3* s vazebným místem pro p53. Kvasinky zařadí produkt PCR do vektoru, který se tak uzavře a může být v kvasince replikován a jeho geny exprimovány. Tím je zajištěna exprese lidského genu *TP53* a genu *LEU2*. Tento postup ilustruje obrázek 1.6. Kvasinky jsou poté vysety na selekční médium bez obsahu leucinu. Buňky, u kterých nedošlo k transformaci, nejsou schopny si samy leucin syntetizovat a nevyrostou. Na selekčním médiu tedy vyrostou pouze buňky, které obsahují vektor s vloženým genem *TP53*. V dalším kroku jsou tyto pozitivní transformanti vyseti na selekční médium s minimálním obsahem histidinu, kde je testována jejich schopnost syntetizovat histidin [16].

### 1.8.3 Gen *ADE2* ve FASAY

Efektivní obměnou, která metodu zrychlila a spojila selekci do jednoho kroku, je nahrazení genu *HIS3* genem *ADE2*, opět s vazebným místem pro p53. Buňky obsahující mutaci v tomto genu v prostředí s malým obsahem adeninu akumulují červený pigment, který je meziproduktem syntézy adeninu. Na selekčním médiu bez leucinu a s minimálním obsahem adeninu tvoří pozitivní transformanti s funkčním proteinem p53 bílé kolonie, protože syntetizují jak leucin, tak adenin (jehož transkripci indukuje právě p53). Buňky s mutantním proteinem p53 tvoří kolonie červené, protože nefunkční protein p53 není schopen zahájit transkripci genu *ADE2*. I vzorek s funkčním proteinem p53 však bude obsahovat malé procento červených kolonií, které představují pozadí této metody (background). Pozadí vzniká především nesprávným sestavením nukleotidové sekvence při PCR amplifikaci a nemělo by tvořit více než 10 % [16].

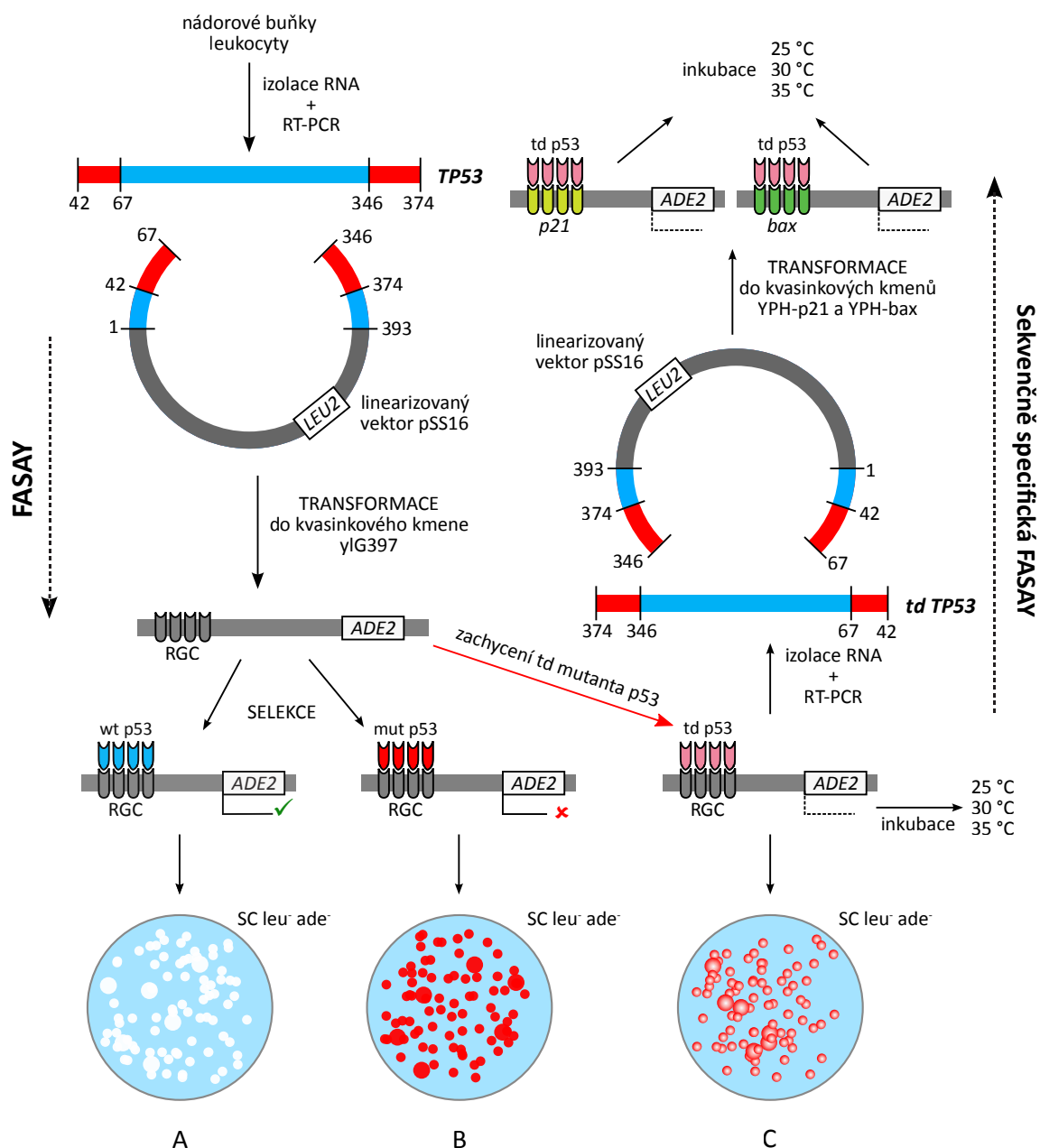
Takto upravená FASAY je navíc schopna rozlišit mutace plně a částečně inaktivní, tedy například mutace teplotně dependentní. Mutace s teplotně dependentním charakterem tvoří na selekčním médiu růžové kolonie různých odstínů a vzorů, v závislosti na funkčních vlastnostech mutantního proteinu p53 [14]. Pro detekci těchto mutací byl k FASAY přidán další krok. Po transformaci jsou kolonie vysety na selekční médium a 2–3 dny inkubovány při teplotě 35 °C, poté 2–3 dny ponechány při pokojové teplotě. Vzhled kvasinkových kolonií pak odráží aktivitu p53 při různých teplotách. V případě teplotně senzitivních mutací mají kolonie červený střed, protože protein p53 je při teplotě 35 °C inaktivní, zatímco okraje kolonie jsou bílé v důsledku reaktivace p53 při nižší teplotě. U chladově senzitivních mutací je tomu naopak [26]. V práci Grochová – Šmardová [56] byla vytvořena barevná stupnice kolonií, která umožňuje porovnat míru transaktivačních schopností mutovaných proteinů p53.

### 1.8.4 Sekvenčně specifická FASAY

Teplotně dependentní mutace často vykazují diskriminativní charakter, tedy jejich transaktivační schopnosti jsou odlišné vzhledem k různým cílovým promotorům. Z toho důvodu byla vyvinuta sekvenčně specifická FASAY, která umožňuje přesněji popsat chování proteinu p53 vůči různým rezponzivním elementům. Dříve byl obecně přijímán názor, že pro určení míry transaktivačních schopností p53 stačí určit jeho schopnost vázat se na regulační sekvenci RGC. Po objevu diskriminativního charakteru p53 byla FASAY upravena tak, aby byla schopna rozlišit schopnost proteinu p53 vázat se na promotory různých genů. Před reportéřský gen *ADE2* byly předřazeny sekvence, které se vyskytují v promotorech genů kódujících proteiny p21, bax, MDM2 a další. Díky tomu je metoda schopna rozlišit transaktivační schopnosti p53 vzhledem k různým reportéřským genům. Bylo zaznamenáno, že p53 má vyšší



afinitu ke genům ovlivňujících buněčný cyklus (*p21*) než ke genům spojeným s apoptózou (*bax*). Míra exprese jednotlivých reportérských genů však přímo závisí na přítomné mutaci a, v případě teplotně dependentních mutací, i na teplotě, ve které jsou buňky inkubovány [14, 16].



Obr. 1.7: Uspořádání experimentů pro FASAY při stanovení funkčních vlastností td mutací p53: a) zachycení standardní formy p53, b) zachycení zcela inaktivní formy p53, c) zachycení p53 s td mutací, následné provedení sekvenčně specifické FASAY pro podrobnou charakterizaci mutace.

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 Seznam chemikálií

Amifostin	MedImmune Pharma, USA
aminokyseliny	Sigma Aldrich, USA
APS	Sigma Aldrich, USA
Bromfenol Blue	Lachema, Česká republika
Coomasie Brilliant Blue	Bio-Rad laboratories, UK
dextróza	Oxoid, UK
EDTA	Sigma Aldrich, USA
Inh. Phosphatase Coctail I	Sigma Aldrich, Izrael
Inh. Protease Coctail I	Sigma Aldrich, EU
kvasinkový extrakt	Oxoid, UK
LiAc	Sigma Aldrich, USA
NP-40 (nondiet=ethylfenyl PEG)	Fluka, Biochemika, Switzerland
otevřený vektor pSS16	ÚPA FN Brno, Jana Šmardová
PBS	Q-bio-gene, North America
Pepton	Oxoid, UK
PMSF	Sigma Aldrich, UK
Roztok Bradfordové	Sigma Aldrich, USA
SDS	Sigma Aldrich, USA
skleněné kuličky	Sigma Aldrich, USA
Sonicated salmon sperm DNA	Sigma Aldrich, UK
TEMED	Sigma Aldrich, China
Tris-Base	Sigma Aldrich, USA
Tris-HCl	Sigma Aldrich, USA
Yeast-nitrogen base	Oxoid, UK
B-merkapttoethanol	Sigma Aldrich, USA

### 2.2 Biologický materiál a média

K analýze transaktivačních schopností teplotně dependentních mutantů byl využit kvasinkový expresní systém *Saccharomyces cerevisiae*, konkrétně kmeny yIG397, YPH-p21 a YPH-bax. Dle charakteru experimentu byly kvasinky kultivovány na kompletním YPDA<sup>++</sup> (pevné nebo tekuté) nebo selektivním SC<sup>--</sup> médiu (pevné nebo tekuté).

**YPDA<sup>++</sup> médium (500 ml):** kvasinkový extrakt ..... 5 g  
 pepton ..... 10 g  
 dextróza ..... 10 g  
 adenin ..... 100 mg  
 doplnit vodou, sterilizace v autoklávu  
 pro pevné médium před sterilizací přidat  
 agar 10 g

**SC<sup>--</sup> médium (500 ml):** yeast-nitrogen base ..... 3,35 g  
 glukóza ..... 10 g  
 roztok aminokyselin ..... 37,5 ml  
 doplnit vodou, sterilizace v autoklávu  
 pro pevné médium před sterilizací přidat  
 agar 12,5 g

roztok aminokyselin (500 ml): L-alanin, L-glycin, L-prolin, L-arginin, L-histidin, L-serin, L-asparagin, myo-inositol, L-threonin, L-kyselina asparagová, L-isoleucin, L-tryptofan, L-cystein, L-lysin, L-tyrosin, L-glutamin, L-methionin, uracil, L-kyselina glutamová, L-fenylalanin, L-valin

každá aminokyselina ..... 0,5 g  
 kyselina p-aminobenzoová ..... 0,05 g  
 adenin ..... 0,025 g  
 doplnit vodou, sterilizace v autoklávu

označení	mutace	DNA sekvence	zdroj
P152L	substituce prolinu v pozici 152 za leucin	CCG→CTG	glioblastom <sup>1</sup>
T155I	substituce threoninu v pozici 155 za isoleucin	ACC→ATC	chronická lymfoidní leukémie (CLL)
R158H	substituce argininu v pozici 158 za histidin	CGC→CAC	chronická lymfoidní leukémie
E171G	substituce kyseliny glutamové v pozici 171 za glycin	GAG→GGG	adenokarcinom <sup>2</sup> plic
T211N	substituce threoninu v pozici 211 za asparagin	ACT→AAT	glioblastom

Tab. 2.1: Seznam studovaných mutací genu *TP53*.

<sup>1</sup>**Glioblastom** je maligní nádor mozku.

<sup>2</sup>**Adenokarcinom** je maligní nádor vzniklý ze žláзовého epitelu.

## 2.3 Stanovení míry teplotní závislosti a diskriminativního charakteru p53

- Transformace buněk yIG397, YPH-p21 a YPH-bax linearizovaným vektorem pSS16 a cDNA p53
- Odečítání fenotypu kvasinkových kolonií

### 2.3.1 Transformace kvasinkových buněk

1. Inokulace<sup>3</sup> kvasinkových buněk do 5 ml YPDA<sup>++</sup> média, kultivace přes noc ve třepačce, 30 °C/200 rpm
2. Inokulace 50 ml YPDA<sup>++</sup> média, nastavení O.D.<sub>600</sub><sup>4</sup> na hodnotu 0,2; kultivace ve 30 °C do O.D.<sub>600</sub> 0,8
3. Centrifugace 5000 rpm/20 °C/5 min
4. Resuspendování sedimentu v 50 ml H<sub>2</sub>O, centrifugace 5000 rpm/20 °C/5 min
5. Resuspendování sedimentu v 10 ml H<sub>2</sub>O, centrifugace 5000 rpm/20 °C/5 min
6. Resuspendování sedimentu v 5 ml roztoku LiAc/TE, centrifugace 5000 rpm/20 °C/5 min
7. Resuspendování sedimentu v 250 µl LiAc/TE, přenesení do mikrozkušavek, centrifugace 14000 rpm/20 °C/10 s
8. Resuspendování sedimentu v 250 µl LiAc/TE
9. Smíchání 50 µl suspenze buněk s transformační směsí v mikrozkušavkách
10. Přidání 300 µl roztoku PEG/LiAc/TE, promíchání, inkubace ve třepačce 200 rpm/30 °C/30 min
11. Zahřátí 42 °C/15 min
12. Centrifugace 14000 rpm/10 s, resuspendování sedimentu ve 200 µl H<sub>2</sub>O
13. Rozetření suspenze transformovaných buněk na Petriho misky se selekčním médiem SC<sup>--</sup> v objemech 180 µl, 20 µl a 5 µl, kultivace 2–3 dny ve 35 °C, poté 2 dny při laboratorní teplotě
14. Vyhodnocení úspěšnosti transformace a charakterizace fenotypu kvasinkových kolonií

**LiAc/TE (na 50 ml kultury):** 10× LiAc ..... 0,6 ml  
10× TE ..... 0,6 ml  
H<sub>2</sub>O ..... 4,8 ml

<sup>3</sup>**Inokulace** je vpravení malého množství kvasinek.

<sup>4</sup>**O.D.<sub>600</sub>** je optická densita (absorbance) při vlnové délce 600 nm.

<b>PEG/LiAc/TE (na 50 ml kultury)</b>	10× LiAc .....	0,3 ml
	10× TE .....	0,3 ml
	50% PEG .....	2,4 ml
<b>10× TE (600 ml):</b>	1M Tris .....	500 ml
	0,5M EDTA .....	100 ml
<b>Transformační směs:</b>	10 mg/ml sonicated salmon sperm DNA:	5 min/100 °C
na ledu:	a následné rychlé ochlazení, centrifugace	
	50 ng otevřeného vektoru pSS16 (1-2 µl)	
	5-10 µl PCR produktu (amplifikované cDNA TP53)	
	5 µl 10mg/ml sonicated salmon sperm DNA	

### 2.3.2 Zamražení kvasinkových kolonií

1. Zaočkování kvasinkových buněk do 2,5 ml SC<sup>-</sup> média, kultivace na třepačce přes noc, 35 °C/200 rpm
2. Zamražení kultury v 25% glycerolu, -80 °C

### 2.3.3 Příprava proteinového lyzátu z kvasinek

1. Zaočkování kvasinkových buněk do 50 ml YPDA<sup>++</sup> média
2. Kultivace ve třepačce, 35 °C/200 rpm, do hodnoty O.D.<sub>600</sub> 0,8
3. Centrifugace 5000 rpm/20 °C/5 min
4. Resuspendování sedimentu v 1 ml H<sub>2</sub>O, ochlazení
5. Centrifugace 14000 rpm/4 °C/30 s
6. Přidání 200 µl lyzačního roztoku a 50 µl skleněných kuliček
7. 1 min intenzivní promíchání a 10 min inkubace na ledu – 3× opakování
8. Centrifugace 14000 rpm/4 °C/30 min
9. Přenesení supernatantu<sup>5</sup> do mikrozkuumavek, uchování při -80 °C

<b>Lyzační roztok:</b>	Inh. Phosphatase cocktail I .....	10 µl
	Inh. Protease cocktail I .....	10 µl
	roztok PMSF .....	10 µl
	lyzační pufr .....	1 ml

<sup>5</sup>Supernatant je tekutina nad sedimentem po rozdělení směsi centrifugací.

<b>Lyzační pufr (500 ml):</b>	NaCl .....	4,38 g
	1% NP-40 .....	5 ml
	1M Tris (pH 8,0) .....	25 ml
	0,5M EDTA (pH 8,0) .....	5 ml
	H <sub>2</sub> O .....	doplnit do 500 ml
<b>Roztok PMSF (5 ml):</b>	PMSF .....	87,1 mg
	isopropanol .....	doplnit do 5 ml

### 2.3.4 Měření koncentrace proteinů podle Bradfordové

1. Smíchání 1  $\mu$ l proteinového lyzátu, 99  $\mu$ l H<sub>2</sub>O a 1 ml roztoku Bradfordové
2. Intenzivní promíchání a inkubace 20 min při laboratorní teplotě
3. Měření optické density při vlnové délce 595 nm
4. Výpočet koncentrace proteinů v lyzátu – podíl O.D.<sub>595</sub> a koeficientu roztoku Bradfordové uváděného dodavatelem nebo dle kalibrační křivky závislosti sestrojené měřením O.D.<sub>595</sub> roztoků proteinu BSA v rozsahu koncentrací 0,5–10  $\mu$ g/ $\mu$ l

### 2.3.5 Elektroforetická separace proteinů pomocí SDS-PAGE

1. Příprava 10% separačního gelu, polymerace
2. Příprava 4% zaostřovacího gelu, nanesení na zpolymerovaný separační gel
3. Smíchání vzorků s 2 $\times$  CSB pufrem
4. Elektroforéza: 30 min v zaostřovacím gelu (80 V), 40–60 min v separačním gelu (120 V)
5. Vizualizace proteinů po dokončení separace

<b>Elektroforetický pufr (1000 ml):</b>	<b>10<math>\times</math> transferový pufr (1000 ml):</b>
H <sub>2</sub> O .....	900 ml
20% SDS .....	5 ml
10 $\times$ transferový pufr .....	100 ml
Tris-base .....	30,3 g
glycin .....	144 g
redestilovaná H <sub>2</sub> O .....	1000 ml

<b>10% separační gel:</b>	<b>4% zaostřovací gel:</b>
H <sub>2</sub> O .....	2,92 ml
30% akrylamid .....	3,2 ml
1M Tris (pH 8,8) .....	3,75 ml
20% SDS .....	50 $\mu$ l
10% APS .....	75 $\mu$ l
TEMED .....	7,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O .....	5,49 ml
30% akrylamid .....	1,05 ml
1M Tris (pH 6,8) .....	0,94 ml
20% SDS .....	37,6 $\mu$ l
10% APS .....	30 $\mu$ l
TEMED .....	10 $\mu$ l

**30% akrylamid:**

akrylamid .....30 g  
 bis-akrylamid .....0,8 g  
 redestilovaná H<sub>2</sub>O ..... 100 ml  
 akrylamid nejprve rozpustit v malém množství H<sub>2</sub>O

**0,2% Bromfenol Blue:**

Bromfenol Blue .....0,2 g  
 Tris-HCl (pH 6,8) ..... 100 ml

**20% SDS:**

SDS ..... 20 g  
 redestilovaná H<sub>2</sub>O ..... 100 ml

**10% APS:**

APS .....0,1 g  
 redestilovaná H<sub>2</sub>O ..... 1 ml

**2× CSB pufr:**

redestilovaná H<sub>2</sub>O ..... 6,9 ml  
 glycerol ..... 2 ml  
 1M Tris-HCl (pH 6,8) ..... 1,2 ml  
 20% SDS ..... 2 ml  
 0,2% Bromfenol Blue ..... 0,4 ml  
 rozdělení do mikrokumavek po 900 µl, uchování při -20 °C  
 před použitím přidání 100 µl β-merkaptoethanolu,  
 5 min/95 °C

**2.3.6 Vizualizace separovaných proteinů**

*Nespecifické barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue*

1. Třepání gelu v barvicím roztoku, 20–30 min
2. Propláchnutí odbarvovacím roztokem a vodou

**Odbarvovací roztok (1000 ml):**

methanol ..... 50 ml  
 kys. octová ..... 75 ml  
 doplnit H<sub>2</sub>O do 1000 ml

**2.3.7 Odečítání fenotypu kvasinkových kolonií**

1. Resuspendování kvasinkových buněk v 50 µl SC<sup>++</sup> média, doplnění SC<sup>++</sup> médiem do 1000 µl
2. Rozetření 10 µl směsi na Petriho misky s SC<sup>++</sup> médiem, kultivace 3-4 dny při teplotách 25 °C, 30 °C a 35 °C
3. Charakterizace fenotypu kvasinkových kolonií

## 2.4 Reaktivace mutovaných forem proteinu p53 pomocí amifostinu

1. Příprava zásobního roztoku amifostinu o koncentraci 980 mM -- sterilní ampule s 500 mg amifostinu + 2,38 ml sterilní vody
2. Aplikace amifostinu na misky s SC<sup>-</sup> médiem – rozetření 36,7 µl roztoku amifostinu na misky s 5 ml SC<sup>-</sup> média, 10 min před nanesením kvasinkových buněk
3. Paralelní kultivace kolonií na miskách s amifostinem (8 mM) a bez amifostinu, 3–4 dny při teplotách 25 °C, 30 °C a 35 °C
4. Vyhodnocení úspěšnosti reaktivace — porovnání fenotypu kvasinkových kolonií na miskách s amifostinem a bez amifostinu



## 3 VÝSLEDKY

V laboratoři molekulární patologie ÚPA FN Brno je FASAY rutinní metodou analýzy stavu nádorového supresoru p53. Pomocí těchto analýz je kontinuálně vytvářen soubor částečně inaktivujících mutací p53. Teplotně dependentní charakter byl prokázán i u mutací: P152L, T155I, R158H, E171G a T211N. V rámci této práce byla blíže charakterizována jejich teplotní závislost a diskriminativní charakter. Byla také hodnocena míra reaktivace mutovaných proteinů amifostinem.

### 3.1 Stanovení funkčních vlastností td mutací p53

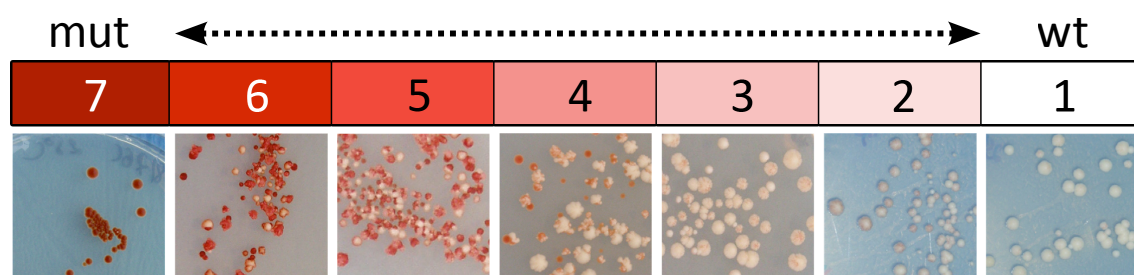
Bližší charakterizace funkčních vlastností mutovaných proteinů p53 byla prováděna v kvasinkových expresních systémech *Sacharomyces cerevisiae* yIG397, YPH-bax a YPH-p21 exprimujících analyzované mutantní varianty p53. Kmen yIG397 obsahuje před reportérským genem *ADE2* responzivní element RGC (ribosomal gene cluster), který sice není přímo spojován s konkrétním genem, ale jedná se o sekvenci, na kterou je standardní forma p53 schopna nasednout. Tyto buňky byly získány během rutinního vyšetření klinických vzorků metodou FASAY. Dále byly připraveny buňky kmenů YPH-p21 a YPH-bax obsahující reportérský gen *ADE2* s responzivními elementy odvozenými z promotorů genů *p21* a *bax*. Tyto buňky byly transformovány všemi sledovanými variantami *TP53*. Míra teplotní závislosti byla sledována kultivací všech zmíněných variant při teplotách 35 °C, 30 °C a 25 °C. Stejně kmény byly použity při studiu reaktivace mutovaných proteinů p53 pomocí amifostinu. Soubor byl doplněn o pozitivní a negativní kontrolu (standardní, „wt“, protein p53 a zcela inaktivní mutace R248W).

#### 3.1.1 Stanovení míry teplotní závislosti mutací p53

Pro stanovení charakteru teplotní závislosti sledovaných mutací p53 byly využity kvasinkové buňky yIG397 s reportérským genem *ADE2* pro syntézu adeninu obsahujícím responzivní element RGC. Míru transaktivačních schopností p53 je tedy možné posoudit dle míry exprese *ADE2*, kterou lze vyhodnotit na základě zbarvení kvasinkových kolonií. V přítomnosti standardního (plně funkčního) proteinu p53 je *ADE2* exprimován, dochází k syntéze adeninu a kolonie vykazují bílé zbarvení. V přítomnosti plně inaktivní formy p53 dochází k hromadění meziproduktu syntézy adeninu a kolonie se zbarvují do červena. Pokud buňky obsahují částečně inaktivující mutaci p53, barva kolonií se nachází na škále mezi červenou a bílou.

Kvasinkové buňky byly transformovány každou ze sledovaných variant *TP53* a inkubovány 2–3 dny na SC<sup>-</sup> médiu s minimálním obsahem adeninu při teplo-

tách 25 °C, 30 °C a 35 °C v několika opakováních. Poté bylo vyhodnoceno zbarvení kvasinkových kolonií pomocí barevné škály sestavené v práci Grochová et al. [56], (obr. 3.1). Hraniční odstíny této škály jsou tvořeny bílou barvou kolonií se standardním p53 (stupeň 1, wt — „wild type“) a červenou barvou kolonií s plně inaktivující mutací (stupeň 7).



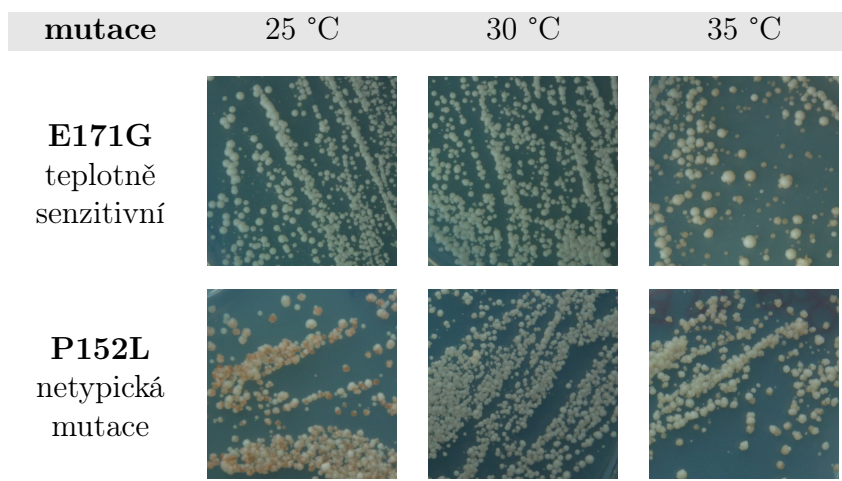
Obr. 3.1: Sedmistupňová škála barevných odstínů kvasinkových kolonií znázorňující míru transkripčních schopností td mutací p53. (Převzato a upraveno z Grochová et al. [56]).

Fenotypové projevy kvasinkových kolonií umožnily rozdělení sledovaných mutací na základě míry exprese *ADE2*, tedy transkripční aktivity p53. Tři z pěti mutací vykazovaly teplotně senzitivní (ts) charakter, pro který je typické snižování transkripčních schopností s rostoucí teplotou. Jako teplotně senzitivní byly vyhodnoceny mutace T155I, E171G a T211N. U všech těchto mutací bylo zaznamenáno snížení inaktivace až za teploty blízké se fyziologické teplotě lidského organismu, tedy 35 °C, za teplot nižších byla aktivita těchto proteinů srovnatelná se standardní formou. Nejméně aktivní z této skupiny byla mutace T211N.

mutace	25 °C	30 °C	35 °C
P152L	5	2	3
T155I	1	1	2
R158H	5,5	1	2,5
E171G	1	1	2
T211N	1	1	2,5

Tab. 3.1: Vyhodnocení teplotně dependentního charakteru studovaných mutací.

U mutací P152L a R158H byl zaznamenán zcela netypický charakter. Při 25 °C vykazovaly obě mutace vysoký stupeň inaktivace, který se při inkubaci ve 30 °C snížil, ve 35 °C však opět došlo ke snížení transkripčních schopností. Mutace R158H vykazovala ve 30 °C transkripční schopnosti téměř srovnatelné se standardní formou proteinu, zatímco po inkubaci ve 35 °C a 25 °C byl protein do značné míry inaktivován.

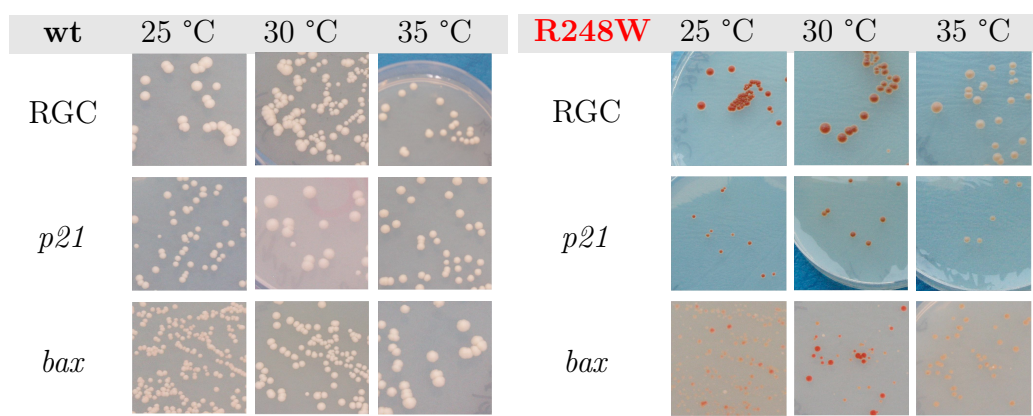


Obr. 3.2: Ukázka fenotypového projevu teplotně senzitivní a netypické mutace p53 v kvasinkových buňkách.

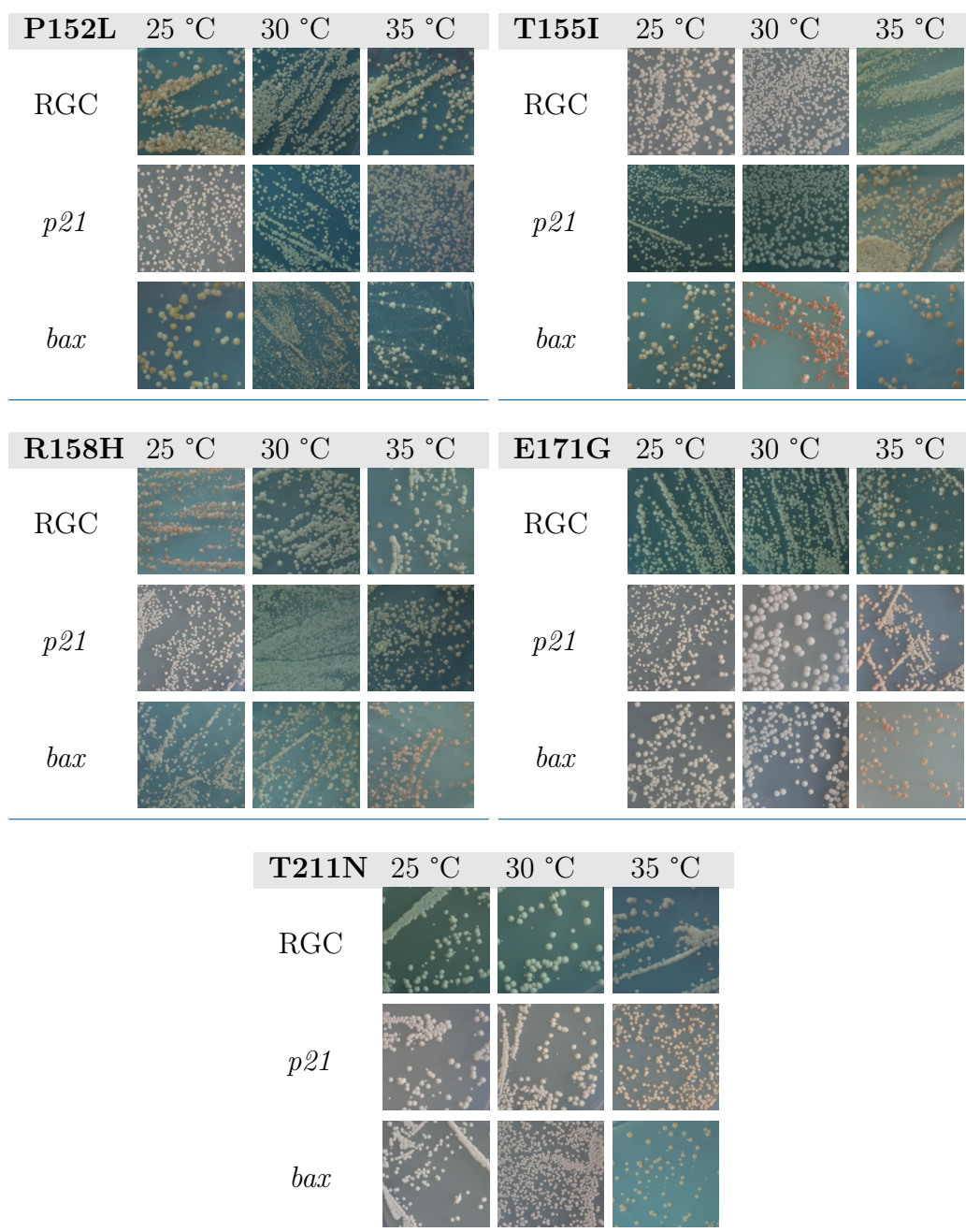
### 3.1.2 Stanovení diskriminativního charakteru td mutací

Pro stanovení diskriminativního charakteru studovaných mutací byly využity kvasinkové kmeny *Sacharomyces cerevisiae*, konkrétně YPH-bax a YPH-p21. Kvasinkové buňky těchto kmenů byly transformovány sledovanými variantami p53. K transformaci byla využita cDNA izolovaná z původně transformovaných buněk kmene yIG397. Transformované buňky YPH-bax a YPH-p21 byly pro každou sledovanou variantu p53 inkubovány při teplotách 25 °C, 30 °C a 35 °C po dobu 2-3 dnů společně s pozitivní a negativní kontrolou. U všech experimentů proběhlo několik opakování, následně byl charakterizován fenotyp jednotlivých variant, a tedy jejich transaktivační schopnosti.

Diskriminativní charakter byl potvrzen u všech pěti mutací, transaktivační schopnosti jednotlivých variant p53 se vzájemně značně lišily jak v závislosti na respon-



Obr. 3.3: Pozitivní a negativní kontrola: standardní forma p53 (wt) a plně inaktivní mutace R248W.



Obr. 3.4: Stanovení diskriminativního charakteru studovaných mutací.

zivním elementu, tak na inkubační teplotě. Obecně vykazovaly všechny studované varianty nižší afinitu k promotoru odvozeného z genu *bax* v porovnání s promotorem odvozeným z genu *p21*, a to ve všech inkubačních teplotách. U dvou studovaných mutací, T211N a E171G, se změny transaktivačních schopností vůči responzivním elementům *p21* a *bax* projevily až při teplotě 35 °C, při teplotách nižších byly jejich transaktivační schopnosti k oběma responzivním elementům srovnatelné se standardní formou p53. Zajímavé bylo, že aktivita obou těchto mutací byla navzájem

mutace	promotor	25 °C	30 °C	35 °C
<b>P152L</b>	RGC	5	2	3
	<i>p21</i>	1	1	2
	<i>bax</i>	4	4	5
<b>T155I</b>	RGC	1	1	2
	<i>p21</i>	1	1	4,5
	<i>bax</i>	3	5	6,5
<b>R158H</b>	RGC	5,5	1	2,5
	<i>p21</i>	1	2	2
	<i>bax</i>	2	2,5	4
<b>E171G</b>	RGC	1	1	2
	<i>p21</i>	1	1	3
	<i>bax</i>	1	1	7
<b>T211N</b>	RGC	1	1	2,5
	<i>p21</i>	1	1	3
	<i>bax</i>	1	1	7
pozitivní kontrola	RGC	1	1	1
	<i>p21</i>	1	1	1
	<i>bax</i>	2	1	1
negativní kontrola	RGC	7	7	7
	<i>p21</i>	7	7	7
	<i>bax</i>	7	7	7

Tab. 3.2: Vyhodnocení diskriminativního charakteru studovaných mutací vzhledem k responzivním elementům RGC, *p21* a *bax*.

stejná v případě obou responzivních elementů, vzhledem k elementu *bax* byly obě mutace zcela inaktivní, vzhledem k *p21* se pak jednalo o střední stupeň inaktivace.

U mutací P152L, T155I a R158H se diskriminativní charakter projevil při inkubaci ve všech třech teplotách, přičemž jejich aktivita byla ve všech případech vyšší vzhledem k responzivnímu elementu *p21*. Nejvíce inaktivní vůči tomuto responzivnímu elementu byla mutace T155I, mutace P152L a R158H vykazovaly pouze mírnou inaktivaci, při teplotách 25 °C a 30 °C vykazovaly všechny sledované varianty transaktivační schopnosti srovnatelné se standardní variantou p53 (mutace R158H ale vykazovala mírně sníženou aktivitu již ve 30 °C). Vzhledem k responzivnímu elementu *bax* byla inaktivace všech těchto tří mutací značná, zejména při 35 °C, kdy se mutace T155I jevila jako téměř zcela inaktivní. I při teplotách nižších byla míra jejich inaktivace nezanedbatelná.

Celkově byly transaktivační schopnosti všech sledovaných variant p53 vzhledem k promotoru *p21* srovnatelné s variantou standardní při teplotách 25 °C a 30 °C, při teplotě 35 °C se jako nejvíce inaktivovaná jevila mutace T155I. Tato mutace byla také z celého souboru celkově nejvíce inaktivní vzhledem k responzivnímu elementu *bax*.

## 3.2 Studium reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu

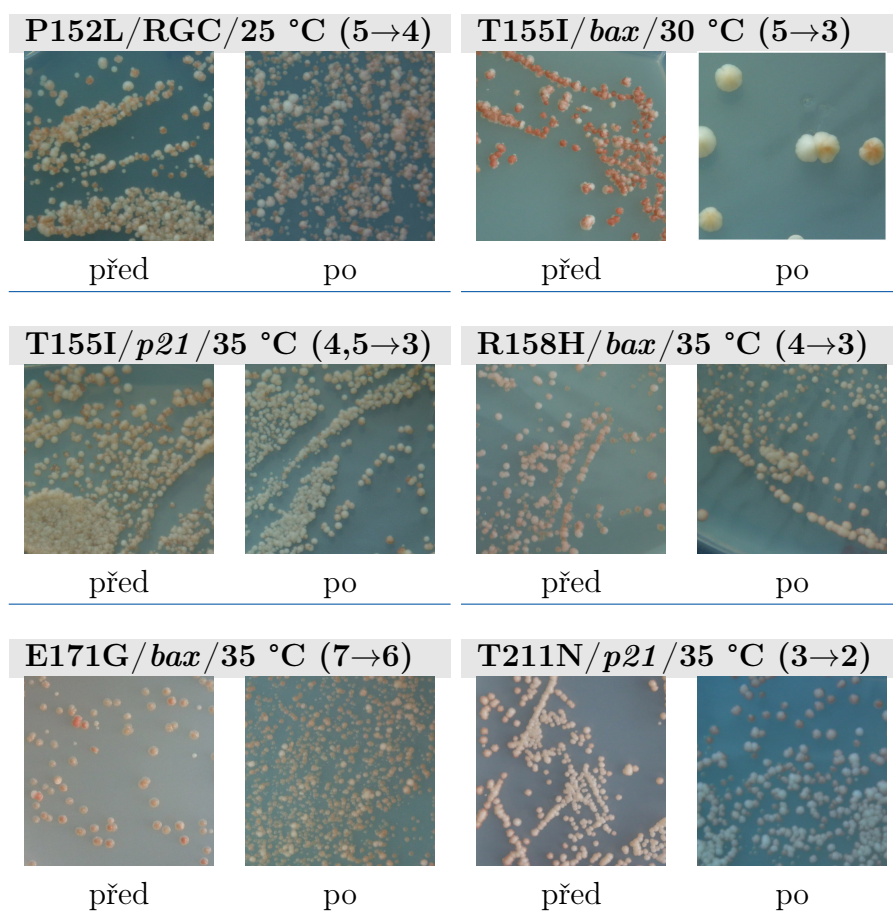
Ke studiu reaktivace souboru teplotně dependentních mutací p53 pomocí amifostinu byly využity kmeny yIG397, YPH-p21 a YPH-bax transformované všemi sledovanými variantami p53. Buňky byly pěstovány na selekčním SC<sup>-</sup> médiu, na které byl 10 minut před vysetím buněk aplikován amifostin v koncentraci 8 mM. Pro srovnání vlivu amifostinu na transkripční schopnosti sledovaných proteinů byly souběžně inkubovány buňky bez amifostinu. Inkubace probíhala opět při teplotách 25 °C, 30 °C a 35 °C. Jako pozitivní a negativní kontrola sloužila standardní forma p53, resp. zcela inaktivní mutace R248W, všechny experimenty byly několikrát opakovány.

U všech studovaných mutací byl potvrzen reaktivující vliv amifostinu alespoň při jedné teplotě a alespoň u jednoho responzivního elementu. Souhrnně je možno konstatovat, že účinky amifostinu byly největší vzhledem k responzivnímu elementu RGC, u dvou mutací (E171G a T155I) se u tohoto responzivního elementu podařilo navrátit transkripční schopnosti tak, že odpovídaly standardní formě p53.

Mutací, u které se reaktivací účinky amifostinu projeví nejvíce, byla mutace T155I, která na amifostin reagovala vzhledem ke všem třem responzivním elementům. Aktivitu proteinu se podařilo zvýšit o 1,5 stupně vzhledem k responzivnímu elementu *p21* při teplotě 35 °C, o 1 stupeň vzhledem k RGC v těžší teplotě, a vzhledem k responzivnímu elementu *bax* o 2 stupně při teplotě 30 °C a o 1 stupeň při

mutace	promotor	25 °C		30 °C		35 °C	
		—	AMF	—	AMF	—	AMF
<b>P152L</b>	RGC	5	4	2	1,5	3	2
	<i>p21</i>	1	1	1	1	2	2
	<i>bax</i>	4	4	4	4	5	5
<b>T155I</b>	RGC	1	1	1	1	2	1
	<i>p21</i>	1	1	1	1	4,5	3,5
	<i>bax</i>	3	2	5	3	6,5	6,5
<b>R158H</b>	RGC	5,5	5	1	1	2,5	1,5
	<i>p21</i>	1	1	2	1,5	2	1,5
	<i>bax</i>	2	2	2,5	2	4	3
<b>E171G</b>	RGC	1	1	1	1	2	1
	<i>p21</i>	1	1	1	1	3	3
	<i>bax</i>	1	1	1	1	7	6
<b>T211N</b>	RGC	1	1	1	1	2,5	2
	<i>p21</i>	1	1	1	1	3	2
	<i>bax</i>	1	1	1	1	7	7

Tab. 3.3: Vyhodnocení reaktivace studovaných mutací pomocí amifostinu.



Obr. 3.5: Reaktivace mutovaných proteinů amifostinem.

teplotě 25 °C. V případě responzivního elementu RGC byly transaktivační schopnosti mutantního proteinu po expozici amifostinem srovnatelné se standardní formou p53.

Další mutací, u které se reaktivace projevila vzhledem ke všem studovaným responzivním elementům, byla mutace R158H. U mutace P152L sice došlo k reaktivaci pouze u responzivního elementu RGC, zvýšení transaktivačních schopností bylo však pozorováno při všech teplotách.

Mutace E171G reagovala na amifostin pouze vzhledem k responzivním elementům RGC a *bax*. Vzhledem k responzivnímu elementu RGC byly transaktivační schopnosti mutantního proteinu po expozici amifostinem srovnatelné se standardní formou proteinu. U této mutace však bylo možné vliv amifostinu studovat pouze ve 35 °C, za teplot nižších totiž transaktivační schopnosti mutantního proteinu odpovídaly formě standardní.

Mutací, která na amifostin reagovala nejméně, byla mutace T211N, u které došlo k reaktivaci pouze vzhledem k responzivním elementům *p21* a RGC.

## 4 DISKUZE

Vzhledem k velkému množství a vzájemné odlišnosti jednotlivých mutací p53 mezi sebou je poměrně těžké hledat společné charakteristiky a řadit mutace do určitých skupin. Mutace p53 lze dělit například podle jejich pozice v peptidovém řetězci. Takovéto strukturní dělení nám však příliš neřekne o vlastnostech a důsledcích dané mutace. Proto je logičtější dělit mutace p53 na základě jejich funkčních vlastností, které velmi úzce souvisí s charakterem aminokyselinové substituce. I bodová substituce aminokyseliny v proteinovém řetězci může způsobit narušení konformace, která je klíčová pro správnou funkci proteinu.

Aminokyselinová substituce může narušit nejen terciární strukturu proteinu jako takovou, ale také její stabilitu jak za standardních, tak za pozměněných podmínek (jakými může být například změna teploty). Pomocí charakteru aminokyselinové substituce lze v mnoha případech vysvětlit chování mutovaného proteinu, zejména jeho afinitu k rezpozivním elementům.

Variabilita mutací p53 je značná, dá se říct, že každá mutace je svým způsobem unikátní jak ve výsledné konformaci proteinu, tak v jeho vlastnostech. Také z tohoto důvodu je žádoucí systematický výzkum jednotlivých mutací, který by nám pomohl najít souvislosti mezi charakterem substituce a vlastnostmi výsledného proteinu, a tedy i přesné důsledky jednotlivých mutací v signálních drahách p53. Na základě těchto znalostí bude v budoucnu možný vývoj cílené terapie k obnovení funkce p53, tedy terapie zaměřené na konkrétní mutace.

### 4.1 Teplotně dependentní charakter

Teplotně dependentní mutace tvoří asi 10 % mutací p53 [39]. Transaktivační schopnosti proteinů s těmi mutacemi jsou proměnné v závislosti na teplotě okolí, což dokládá, že konkrétní aminokyselinové substituce způsobují termodynamickou nestabilitu proteinu, který je tak náchylný ke změnám konformace. Fyziologická teplota 37 °C však vytváří podmínky, za kterých je DNA-vazebná doména málo stabilní i u standardní formy p53 a přechází mezi složenou a rozvolněnou konformací. Z tohoto důvodu je p53 citlivý k destabilizujícím mutacím [59].

Díky těmto mutacím bylo zjištěno, že inaktivace proteinu je v množství případů reverzibilní, což otevírá široké možnosti k aplikaci těchto poznatků do onkologické terapie, jelikož obnovením funkce p53 je možné navrátit postiženým buňkám normální fyziologickou funkci. Až 25 % těmto mutacím je lokalizováno v oblasti  $\beta$ -sendviče, který zprostředkovává správné sbalování proteinu. Mutace v této oblasti mají tedy vliv na konformaci proteinu, která ve značné míře může ovlivnit jeho vlastnosti. Substituce aminokyseliny může konformaci proteinu ovlivnit zejména změnou interakcí



sousedních aminokyselin, problémem může být také změna orientace aminokyseliny v dané poloze (dovnitř/ven ze struktury) [60].

V této práci byl charakterizován soubor pěti mutací, u všech z nich byl potvrzen teplotně dependentní charakter. Podle charakteru teplotní závislosti bylo studované mutace možno rozdělit do dvou skupin: na teplotně senzitivní mutace (E171G, T211N a T155I) a mutace s netypickým charakterem (R158H a P152L). Byly pozorovány značné rozdíly jak mezi oběma skupinami, tak mezi mutacemi v rámci jedné skupiny.

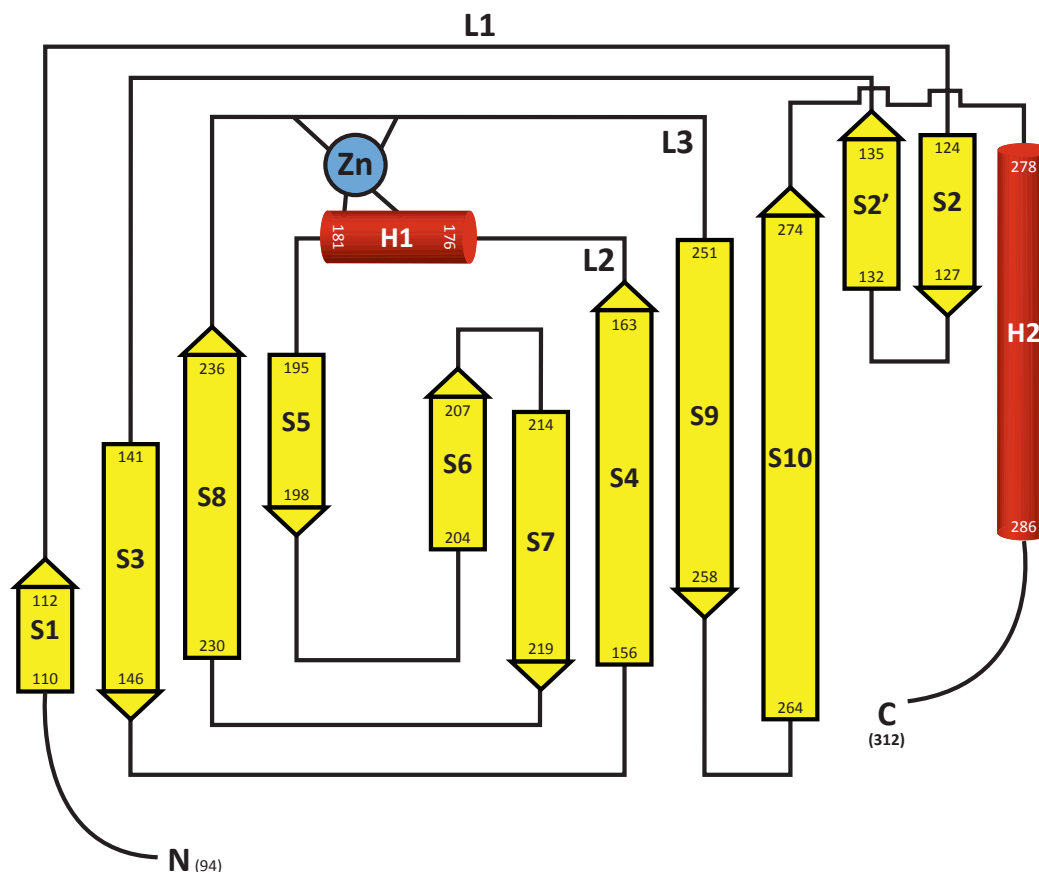
Všechny studované mutace se nacházejí v DNA-vazebné doméně p53 [61], většina z lokací navíc za normálních podmínek spojuje dohromady jednotlivé subdomény; značný vliv na transkripční schopnosti proteinu se tedy dal předpokládat.

Ve skupině ts mutací se transkripční schopnosti jednotlivých mutovaných proteinů vzhledem k responzivnímu elementu RGC významněji nelišily. Za teplot 25 °C a 30 °C byla jejich aktivita srovnatelná se standardní formou p53, za teploty blízké teplotě fyziologické (35 °C) se jejich aktivita mírně snížila. Zajímavější však bylo změnou teploty indukované chování těchto mutací vzhledem k responzivnímu elementu *bax*. Zde byl mezi jednotlivými ts mutacemi pozorován významný rozdíl. Od druhých dvou mutací výrazně odlišovala mutace T155I, která vykazovala značný stupeň inaktivace ve všech třech teplotách.

Aktivita mutací P152L a R158H byla vzhledem k responzivnímu elementu RGC za všech teplot srovnatelná, oproti standardní variantě p53 však značně snížena. Vzhledem k responzivním elementům *p21* a *bax* byl však charakter teplotní závislosti obou mutací zcela odlišný než v případě responzivního elementu RGC. Vzhledem k těmto promotorům se obě mutace chovaly jako teplotně senzitivní, vykazující poměrně mírné snížení aktivity vzhledem k *p21*, v případě responzivního elementu *bax* byla aktivita těchto mutací různá. Mutace P152L vykazovala aktivitu značně sníženou, zatímco R158H byla inaktivována mírněji.

## 4.2 Diskriminativní charakter

Dřívější studie potvrdily u td mutací diskriminativní charakter. To znamená, že aktivita mutovaných proteinů se liší vzhledem k různým responzivním elementům, vůči některým může být částečně nebo zcela zachována, zatímco vůči jiným může být protein zcela inaktivní. Celkově je afinita proteinu p53 nižší vzhledem k responzivnímu elementu *bax* v porovnání s *p21*, a to jak u varianty standardní, tak u varianty mutované. V konsensus sekvenci promotoru genu *bax* se totiž nachází 3 nukleotidové záměny oproti „klasické“ konsensus sekvenci, zatímco promotor genu *p21* má tyto záměny pouze dvě. Byl popsán vliv třetí nukleotidové záměny promotoru *bax* na vazbu p53 s DNA, další příčinou rozdílné afinity může být také přítomnost nukleo-



Obr. 4.1: Topologický diagram sekundární struktury centrální DNA-vazebné domény proteinu p53. Převzato a upraveno z Cho et al. [61].

tidů AA v centrální části konsensus sekvence na rozdíl od dvojice AT u genu *p21* (přítomnost dvojice AA v centru konsensus sekvence je obecně spojována s nižší afinitou proteinu vůči responzivnímu elementu). Vzdálenost dvou dekamerů konsensus sekvence je také u genu *bax* větší než v případě *p21* [19, 26, 62].

Klasický diskriminativní charakter byl potvrzen u všech mutací studovaného souboru. Aktivita vzhledem k responzivnímu elementu *p21* se u všech kromě jedné mutace změnila až za teploty 35 °C, za teplot nižších byla srovnatelná se standardním p53. Pouze u mutace R158H bylo zaznamenáno mírné snížení aktivity již při teplotě 30 °C. Dle aktivity vzhledem k responzivnímu elementu *bax* lze studované mutace rozdělit do dvou skupin.

U mutací T211N a E171G byla inaktivace p53 zaznamenána až při teplotě 35 °C, tato inaktivace však byla kompletní. Kyselina glutamová na pozici 171 pomocí solného můstku<sup>1</sup> s argininem na pozici 249 stabilizuje oblast smyček L2 a L3 [60]. Při jeho substituci za glycin je tato vazba ztracena. Kyselina glutamová v této poloze

<sup>1</sup>**Solný můstek** je interakce mezi záporně nabitou karboxylovou skupinou a kladně nabitou aminoskupinou způsobenou elektrostatickou silou a tvorbou vodíkových vazeb.

se navíc účastní tetramerizace proteinu [60], což může být dalším důvodem nízké aktivity této mutace vůči responzivnímu elementu *bax*, který má netypickou rozpoznávací sekvenci. Aktivita dimerní i monomerní jednotky p53 je obecně spojena s výrazně nižší transaktivační schopností (20% aktivita oproti tetrameru) [63]. Tato aminokyselina ovšem není jediným prvkem účastnícím se tetramerizace, a za nižších teplot tak může být rovnováha stále posunuta směrem ke správné konformaci p53. Mutace T211N se nachází na smyčce mezi  $\beta$ -vláknky S6 a S7 (viz obr. 4.1).

U ostatních mutací bylo snížení aktivity p53 vzhledem k responzivnímu elementu *bax* pozorováno při všech studovaných teplotách. S rostoucí teplotou se aktivita proteinu snižovala. Nejvíce inaktivní vzhledem k responzivnímu elementu *bax* byla celkově mutace T155I. Celkově nejmenší míru inaktivace k responzivnímu elementu *bax* ve všech třech teplotách vykazovala mutace R158H. Arginin na pozici 158 za normálních okolností stabilizuje S9  $\beta$ -vlákno pomocí solného můstku s kyselinou glutamovou na pozici 258 [64].

### 4.3 Reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu

Zjištění, že inaktivace p53 není nezvratná, vyústilo v množství otázek o možné reaktivaci mutovaného proteinu p53, která by umožnila navrátit maligně transformovaným buňkám jejich fyziologickou funkci. Jednou z kandidátních terapií je využití malých molekul, které by vazbou k proteinu byly schopny jej uvést do správné konformace a vrátit mu tak jeho fyziologickou funkci. Jelikož každá mutace p53 má specifický charakter, hledat nějakou univerzální molekulu je obtížné. Ne všechny mutace jsou také vhodnými uchazeči k terapii malými molekulami. Tato terapie má svůj potenciál zejména u mutací nacházejících se v centrálním  $\beta$ -sendviči DNA-vazebné domény, důsledkem nichž dochází ke vzniku „puklin“ ve struktuře p53. Malé molekuly by se mohly navázat právě do těchto pozmeněných míst a sloužit jako „podpěra“, která by mohla pomoci proteinu navrátit se do své standardní konformace a obnovit tak svoji funkci v nádorových tkáních. Obtížnější je reaktivovat mutaci, která ruší vazbu se zinkem či mění aminokyselinu přímo interagující s DNA [26].

V této práci byly studovány účinky jedné z kandidátních molekul, amifostinu, na funkci mutovaných proteinů p53. Amifostin byl původně objeven jako chemo- a radio-protektivní látka, jeho aktivovaná forma je pomocí své -SH skupiny schopna vychytávat volné radikály. Později byly zjištěny jeho reaktivační účinky na p53 nesoucí mutaci, přesný mechanismus doposud není znám, předpokládá se, že -SH skupina aktivní formy amifostinu stimuluje molekuly cysteinu v DNA-vazebné doméně, čímž zvyšuje afinitu proteinu k DNA [56].

Reaktivující účinky amifostinu se podařilo potvrdit u všech studovaných mutací alespoň při jedné inkubační teplotě a vzhledem k jednomu responzivnímu elementu. Odpovědi jednotlivých mutací se lišily jednak v závislosti na responzivním elementu, a také na inkubační teplotě. Nejvýraznější reaktivace byla celkově pozorována vzhledem k responzivnímu elementu RGC. U některých mutací však za nižších teplot nebylo možné říci, zda amifostin nějaký účinek má, jelikož mutantní protein v těchto případech vykazoval standardní transaktivační schopnosti.

Mutací, u které se reaktivující účinky amifostinu projeví nejvíce, byla mutace T155I, kde se transaktivační schopnosti podařilo zvýšit o 1,5 stupně vzhledem k responzivnímu elementu *p21* při teplotě 35 °C, o 1 stupeň vzhledem k responzivnímu elementu RGC, a vzhledem k responzivnímu elementu *bax* dokonce o 2 stupně při teplotě 30 °C a o 1 stupeň při teplotě 25 °C.

### 4.3.1 Opravdu stačí obnovení funkce jednoho proteinu k odstranění tumoru?

Funkce p53 jako nádorového supresoru je pro buňku v procesech bránícím vzniku tumoru nezbytná. Při kancerogenezi je však jeho funkce částečně nebo zcela inhibována za účelem další progresu nádorových buněk. Je však pro nádor zásadní, aby byly dráhy p53 jedním krokem inaktivovány? Stačí k regresi tumoru „pouhé“ obnovení standardní funkce p53 následované apoptózou? *In vivo* studie na myších prokázaly [65], že inaktivace signálních drah p53 je pro rozvoj a „přežití“ nádoru nezbytná. Reaktivace drah p53 však vedla ke spontánnímu obnovení mechanismů apoptózy a regresi tumorů. Toto naznačuje, že i v maligně transformovaných buňkách jsou stále přítomny signály vedoucí k aktivaci drah p53. Jak Martins et al. [65] ukazuje, i po obnovení funkce p53 však hrozí vznik rezistence na další linii p53-reaktivující léčby. Tumory jsou v řadě případů schopné najít jinou cestu inaktivace drah p53, kterou může být např. ztráta proteinu p19<sup>ARF</sup>, který je mediátorem tumor-supresorové buněčné odpovědi p53.

## ZÁVĚR

V této práci byly analyzovány funkční vlastnosti souboru pěti mutací nádorového supresoru p53, stanovena jejich teplotní závislost a diskriminativní charakter. Teplotně dependentní charakter byl potvrzen u všech studovaných mutací, soubor byl rozdělen na mutace teplotně senzitivní (T211N, E171G, a T155I) a mutace s netypickým charakterem (P152L a R158H). Všechny teplotně senzitivní mutace vykazovaly snížení aktivity až při téměř fyziologické teplotě 35 °C, za teplot nižších byla jejich aktivita srovnatelná se standardní formou p53. Jako nejvíce inaktivní se z této skupiny ukázaly být mutace E171G a T211N. Mutace s netypickým charakterem vykazovaly nejvyšší aktivitu při 30 °C, při vyšší i nižší teplotě byla aktivita nižší.

U všech studovaných mutací byl také popsán diskriminativní charakter. Obecně byla afinita všech sledovaných variant p53 vyšší k promotoru odvozeného od genu *p21*, než k promotoru odvozeného od genu *bax*. U mutací E171G a T211N se diskriminativní charakter projevil až při teplotě 35 °C, zatímco u ostatních mutací jej bylo možné pozorovat za všech studovaných teplot.

U celého souboru byla také studována možnost reaktivace mutovaných proteinů pomocí amifostinu, částečné obnovení funkcí bylo pozorováno u všech studovaných mutací. Největší reaktivační účinky byly v souhrnu pozorovány vzhledem k promotoru RGC. Mutací, u které se účinky amifostinu projeví nejvíce, byla mutace T155I.

Vzhledem ke stále se zvyšující incidenci a vysoké mortalitě maligních onemocnění je třeba orientovat výzkum na hledání příčin nádorů na molekulární úrovni a vývoj nové, cílenější léčby. Nádory s defektními signálními dráhami p53 jsou často chemo- i radio-rezistentní, terapie usilující o obnovu funkce tohoto nádorového supresoru jsou tedy nadějí do budoucna. K vývoji takto cílené terapie je však třeba detailní znalost účinků jednotlivých mutací a jejich principů.

## LITERATURA

- [1] KLENER, P. *Klinická onkologie*. 1. vydání. Praha: Galén – Karolinum, c2002. 491 s. ISBN 80-7262-151-3, s. 1, 39–49, 145, 174–175.
- [2] ŠLAMPÁ, P. – PETERA, J. et al. *Radiační onkologie*. 1. vydání. Praha: Galén – Karolinum, 2007. 457 s. ISBN 80-246-1443-3, s. xvii.
- [3] *Disease and injury country estimates: Burden of disease* [online]. World Health Organization, c2008. [cit. 2013-02-03]. Dostupné z: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_country/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html).
- [4] PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation*. 2007, 28, 6, s. 622–629. ISSN 1098-1004. doi: 10.1002/humu.20495.
- [5] HANAHAN, D. – WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000, 100, 1, s. 57–70. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [6] ADAM, Z. – VORLÍČEK, J. – KOPTÍKOVÁ, J. *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Praha: Grada Publishing, 2003. 788 s. ISBN 80-247-0677-6, s. 59.
- [7] GU, W. – ROEDER, R. G. Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*. 1997, 90, 4, s. 595–606. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80521-8.
- [8] LUO, J. et al. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*. November 2000, 408, 6810, s. 377–381. doi: 10.1038/35042612.
- [9] HANAHAN, D. – WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. March 2011, 144, 5, s. 646–674. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [10] VOUSDEN, K. H. – LANE, D. P. p53 in health and disease. *Nature*. April 2007, 445, 4, s. 275–283. ISSN 1471-0072. doi: 10.1038/nrm2147.
- [11] YU, J. – ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 331, 3, s. 851–858. ISSN 0006-291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.189. p53 in Apoptosis Control.
- [12] ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*. 5. vydání. New York: Garland, 2007. 1392 s. ISBN 9780815341055, s. 304–316, 1115–1128.

- [13] ADÁMKOVÁ KRÁKOROVÁ, D. *Prognostický význam Ki-67, p53, p-glykoproteinu, HER-2, CD133 a nestin pozitivních buněk v léčbě high-grade osteogenních sarkomů dospělého věku*. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, 2012. Vedoucí práce Jaroslav Štěrba. s. 19.
- [14] JAGOŠOVÁ, J. Analýza teplotně senzitivních mutantů nádorového supresoru p53 [online]. Brno, 2011. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jana Šmardová. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/211280/prif\\_m/](http://is.muni.cz/th/211280/prif_m/). s. 1, 9–10, 14–20.
- [15] SELIVANOVA, G. – WIMAN, K. G. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene*. 2007, 26, 15, s. 2243–2254. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1210295.
- [16] ŠMARDOVÁ, J. – ŠMARDA, J. – KOPTÍKOVÁ, J. Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast. *Differentiation*. 2005, 73, 6, s. 261–277. ISSN 0301-4681. doi: 10.1111/j.1432-0436.2005.00028.x.
- [17] KITAYNER, M. et al. Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Molecular Cell*. 2006, 22, 6, s. 741–753. ISSN 1097-2765. doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.015.
- [18] MENENDEZ, D. – INGA, A. – RESNICK, M. The expanding universe of p53 targets. *Nature Reviews Cancer*. October 2009, 9, 10, s. 724–737. ISSN 1474-175X. doi: 10.1038/nrc2730.
- [19] MENENDEZ, D. – INGA, A. – RESNICK, M. Potentiating the p53 Network. *Discovery medicine*. July 2010, 10, 50, s. 94–100. ISSN 1539-6509.
- [20] MENENDEZ, D. – INGA, A. – RESNICK, M. Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. *Oncogene*. 2007, 26, 15, s. 2191–2201. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1210277.
- [21] KIM, Y.-Y. et al. Modification of serine 392 is a critical event in the regulation of p53 nuclear export and stability. *FEBS Letters*. 2004, 572, 13, s. 92–98. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.014.
- [22] PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007, 26, 15, s. 2157–2165. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1210302.
- [23] BUTLER, J. S. – LOH, S. N. Structure, Function, and Aggregation of the Zinc-Free Form of the p53 DNA Binding Domain†. *Biochemistry*. 2003, 42, 8, s. 2396–2403. doi: 10.1021/bi026635n.

- [24] FUSTER, J. J. et al. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2007, 13, 5, s. 192–199. ISSN 1471-4914. doi: 10.1016/j.molmed.2007.03.002.
- [25] WANG, X. – JIANG, X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS Letters*. 2012, 586, 10, s. 1390–1396. ISSN 0014-5793. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.049.
- [26] GROCHOVÁ, D. *Funkční analýza teplotně senzitivních mutantů nádorového supresoru p53 [online]*. Disertační práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno, 2008. Vedoucí práce Jana Šmardová. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/14699/prif\\_d/](http://is.muni.cz/th/14699/prif_d/). s. 1, 16–20, 24–31, 33–37.
- [27] FREED-PASTOR, W. A. – PRIVES, C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development*. 2012, 26, 12, s. 1268–1286. doi: 10.1101/gad.190678.112.
- [28] SOUSSI, T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene*. 2007, 26, 15, s. 2145–2156. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/sj.onc.1210280.
- [29] SOUSSI, T. – LOZANO, G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, 331, 3, s. 834–842. ISSN 0006-291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.190. p53 in Apoptosis Control.
- [30] MACHADO-SILVA, A. – PERRIER, S. – BOURDON, J.-C. p53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Seminars in Cancer Biology*. 2010, 20, 1, s. 57–62. ISSN 1044-579X. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.02.005.
- [31] SOUSSI, T. – WIMAN, K. G. Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell*. 2007, 12, 4, s. 303–312. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccr.2007.10.001.
- [32] WONG, K.-B. et al. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, 96, 15, s. 8438–8442. doi: 10.1073/pnas.96.15.8438.
- [33] ADORNO, M. et al. A Mutant-p53/Smad Complex Opposes p63 to Empower TGF $\beta$ -Induced Metastasis. *Cell*. 2009, 137, 1, s. 87–98. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.039.
- [34] MULLER, P. A. et al. Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell*. 2009, 139, 7, s. 1327–1341. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.026.



- [35] NOLL, J. E. et al. Mutant p53 drives multinucleation and invasion through a process that is suppressed by ANKRD11. *Oncogene*. June 2012, 31, 23, s. 2836–2848. ISSN 0950-9232. doi: 10.1038/onc.2011.456.
- [36] BLAGOSKLONNY, M. V. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *The FASEB Journal*. 2000, 14, 13, s. 1901–1907. doi: 10.1096/fj.99-1078rev.
- [37] LUDWIG, R. L. – BATES, S. – VOUSDEN, K. H. Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Molecular and Cellular Biology*. 1996, 16, 9, s. 4952–4960.
- [38] DEARTH, L. R. et al. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*. 2006, 28, 2, s. 289–298. doi: 10.1093/carcin/bgl132.
- [39] SHIRAIISHI, K. et al. Isolation of Temperature-sensitive p53 Mutations from a Comprehensive Missense Mutation Library. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279, 1, s. 348–355. doi: 10.1074/jbc.M310815200.
- [40] LEVINE, A. J. – HU, W. – FENG, Z. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. March 2006, 13, 6, s. 1027–1036. doi: 10.1038/sj.cdd.4401910.
- [41] EFEYAN, A. – SERRANO, M. p53: Guardian of the Genome and Policeman of the Oncogenes. *Cell Cycle*. May 2007, 6, 9, s. 1006–1010. doi: 10.4161/cc.6.9.4211.
- [42] BARGONETTI, J. – MANFREDI, J. J. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current Opinion in Oncology*. January 2002, 14, 1, s. 86–91.
- [43] SENZER, N. et al. p53 therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007, 6, 5, s. 1478–1482. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0125.
- [44] LANE, D. P. – CHEOK, C. F. – LAIN, S. p53-based Cancer Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, 2, 9. doi: 10.1101/cshperspect.a001222.
- [45] SALLER, E. et al. Increased apoptosis induction by 121F mutant p53. *EMBO Journal*. October 1999, 18, 16, s. 4424–4437. doi: 10.1093/emboj/18.16.4424.

- [46] PHELAN, A. – ELLIOTT, G. – O'HARE, P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nature Biotechnology*. May 1998, 16, 5, s. 440–443. doi: 10.1038/nbt0598-440.
- [47] CHEOK, C. F. et al. Translating p53 into the clinic. *Nature Reviews Clinical Oncology*. January 2011, 8, 1, s. 25–37. ISSN 1759-4774. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.174.
- [48] BISCHOFF, J. et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science (New York, N.Y.)*. October 1996, 274, 5286, s. 373–376. doi: 10.1126/science.274.5286.373.
- [49] KHURI, F. R. et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine*. August 2000, 6, 8, s. 879–885. doi: 10.1038/78638.
- [50] XIA, Z.-J. et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai Zheng*. December 2004, 23, 12, s. 1666–1670.
- [51] EDWARDS, S. J. et al. Evidence that Replication of the Antitumor Adenovirus ONYX-015 Is Not Controlled by the p53 and p14ARF Tumor Suppressor Genes. *Journal of Virology*. 2002, 76, 24, s. 12483–12490. doi: 10.1128/JVI.76.24.12483-12490.2002.
- [52] YAMAMOTO, M. – CURIEL, D. T. Current Issues and Future Directions of Oncolytic Adenoviruses. *Molecular Therapy*. November 2009, 18, 2, s. 243–250. ISSN 1525-0016. doi: 10.1038/mt.2009.266.
- [53] MARTINEZ, L. A. et al. Synthetic small inhibiting RNAs: Efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, 99, 23, s. 14849–14854. doi: 10.1073/pnas.222406899.
- [54] *National Center for Biotechnology Information* [online]. PubChem Compound Database; CID=2141. [cit. 2013-02-05]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2141>.
- [55] *National Center for Biotechnology Information* [online]. PubChem Compound Database; CID=104807. [cit. 2013-02-17]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=104807>.

- [56] GROCHOVÁ, D. – ŠMARDOVÁ, J. The antimutagenic and cytoprotective effects of amifostine: the role of p53. *Journal of Applied Biomedicine*. November 2007, 5, 4, s. 171–178. ISSN 1214-021X.
- [57] ISHIOKA, C. et al. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nature Genetics*. October 1993, 5, 2, s. 124–129. doi: 10.1038/ng1093-124.
- [58] FLAMAN, J. M. et al. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, 92, 9, s. 3963–3967. doi: 10.1073/pnas.92.9.3963.
- [59] BUTLER, J. S. – LOH, S. N. Kinetic Partitioning During Folding of the p53 DNA Binding Domain. *Journal of Molecular Biology*. 2005, 350, 5, s. 906–918. ISSN 0022-2836. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.060.
- [60] JOERGER, A. C. – FERSHT, A. R. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*. 2007, 26, 15, s. 2226–2242. doi: 10.1038/sj.onc.1210291.
- [61] CHO, Y. J. et al. Crystal-structure of a p53 tumor-suppressor DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science*. July 1994, 265, 5170, s. 346–355. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.8023157.
- [62] FLAMAN, J. M. et al. Identification of human p53 mutations with differential effects on the *bax* and *p21* promoters using functional assays in yeast. *Oncogene*. March 1998, 16, 10, s. 1369–1372. ISSN 0950-9232.
- [63] PAVLETICH, N. P. – CHAMBERS, K. A. – PABO, C. O. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes & Development*. 1993, 7, 12b, s. 2556–2564. doi: 10.1101/gad.7.12b.2556.
- [64] FULCI, G. et al. Initiation of Human Astrocytoma by Clonal Evolution of Cells with Progressive Loss of p53 Functions in a Patient with a 283H TP53 Germ-line Mutation: Evidence for a Precursor Lesion. *Cancer Research*. 2002, 62, 10, s. 2897–2905.
- [65] MARTINS, C. P. – BROWN-SWIGART, L. – EVAN, G. I. Modeling the Therapeutic Efficacy of p53 Restoration in Tumors. *Cell*. 2006, 127, 7, s. 1323–1334. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.007.

## SLOVNÍČEK POJMŮ

**adenokarcinom** je maligní nádor vzniklý ze žláзовého epitelu.

**angiogeneze** je proces rozvoje nové krevní sítě ve tkáni (také neovaskularizace).

**buněčná senescence** je proces biologického stárnutí buňky.

**buněčná transformace** je proces umělého vnesení cizorodé DNA do buňky. U eukaryotních organismů se tento proces častěji nazývá transfekce.

**exon** je kódující oblast genu.

**fáze G<sub>1</sub> buněčného cyklu** je fáze, během které buňka roste a kontroluje svůj stav před replikací DNA.

**glioblastom** je maligní nádor mozku.

**homologní proteiny** jsou proteiny mající vysoký stupeň homologie na úrovni sekvence nukleotidů nebo aminokyselin. Často tvoří tzv. proteinové rodiny, některé funkce mají podobné.

**homologní rekombinace** genetická záměna dvou homologních (identických nebo jen málo odlišných) sekvencí DNA [12].

**inokulace** je vpravení malého množství kvasinek.

**konsensus sekvence** je obecná sekvence, na kterou je p53 schopen se navázat (dvě sekvence deseti nukleotidů oddělených spacerem 0–13 bází, nejčastěji 0–3 [18]).

**nádorový supresor** je gen, který omezuje buněčnou transformaci (Potlačuje vznik nádoru.)

**O.D.<sub>600</sub>** je optická densita (absorbance) při vlnové délce 600 nm.

**onkogen** je gen, který způsobuje transformaci zdravé buňky v nádorovou. Vzniká patologickou změnou normálních genů řídících buněčný růst a diferenciaci.

**plazmid** je kruhová DNA.

**siRNA** (small interfering RNA) jsou molekuly RNA o délce 20–25 nukleotidů, které se uplatňují při RNA interferenci (Jev, kdy RNA ovlivňuje míru transkripce určitého genu.)

**solný můstek** je interakce mezi záporně nabitou karboxylovou skupinou a kladně nabitou aminoskupinou způsobenou elektrostatickou silou a tvorbou vodíkových vazeb.

**supernatant** je tekutina nad sedimentem po rozdělení směsi centrifugací.

**tichá mutace** je substituce bází v tripletu, která nemění aminokyselinu ve výsledném proteinu.

**transfekce** je proces přenosu genetického materiálu do eukaryotní buňky.

**transkripční faktor** je protein se schopností iniciovat transkripci specifických genů.

## SEZNAM ZKRATEK

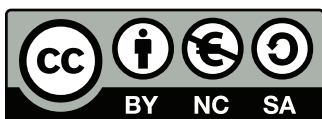
<b>AMF</b>	amifostin
<b>APS</b>	Ammonium PerSulfate
<b>bax</b>	Bcl-2-associated X protein
<b>cDNA</b>	komplementární DNA
<b>cs</b>	chladově senzitivní
<b>EDTA</b>	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
<b>FASAY</b>	Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast
<b>LiAc</b>	octan lithný
<b>MDM2</b>	Mouse Double Minute 2 homolog
<b>NMR</b>	nukleární magnetická rezonance
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PEG</b>	PolyEthylenGlykol
<b>PMSF</b>	PhenylMethaneSulfonylFluoride
<b>RGC</b>	Ribosomal Gene Cluster
<b>SC</b>	Synthetic Complete medium
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>siRNA</b>	Small Interfering RNA
<b>td</b>	teplotně dependentní
<b>TEMED</b>	TEtraMethylEthyleneDiamine
<b>Tris</b>	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
<b>ts</b>	teplotně senzitivní
<b>YPDA</b>	yeast, peptone, dextrose, adenine

# L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X

Sazba proběhla v typografickém prostředí L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X2e (L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X Project Public License).



Ke tvorbě ilustrací byly použity aplikace Inkscape 0.48.2 (GNU GPL v2), Adobe Illustrator CS6 (studentská licence) a MacPyMOL v1.3 (akademická licence).



Tato práce je licencována pod Creative Commons Attribution 3.0.