

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06 ZDRAVOTNICTVÍ

ÚLOHA PROTEINU PARP1 PŘI REGULACI AKTIVITY NÁDOROVÉHO SUPRESORU p53

Denisa Patková

Praha, 2020

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 06 ZDRAVOTNICTVÍ

ÚLOHA PROTEINU PARP1 PŘI REGULACI AKTIVITY NÁDOROVÉHO SUPRESORU p53

THE ROLE OF PARP1 PROTEIN IN REGULATING THE TUMOR SUPPRESSOR ACTIVITY p53

Autoři: Denisa Patková
Škola: Obchodní akademie Heroldovy sady 1
101 00 Praha 10
Kraj: Praha
Konzultant: Mgr. Stjepan Uldrijan, CSc.

PRAHA, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ na téma „Úloha proteinu PARP-1 při regulaci aktivity nádorového supresoru p53“ vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Stjepana Uldrijana, CSc. a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Dále prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Děkuji Mgr. Stjepanu Uldrijanovi, CSc. za odborné vedení práce, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále mé poděkování patří všem členům týmu Laboratoře nádorové biologie na Biologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity za pomoc, rady a podporu.

Anotace

V práci jsem se věnovala aktivitě nádorového supresoru p53 v buňkách maligního melanomu za použití inhibitorů PARP. Protein p53 má hraje zásadní roli v inhibici buněčné proliferace po poškození DNA. Jakmile dojde k nezvratnému poškození buňky, p53 může aktivovat apoptózu. Nádorové buňky mají aktivitu p53 sniženou či zcela inhibovanou a programovaná smrt po poškození DNA nemusí nastat, což umožní další dělení buněk, předávání mutací a poškození dceřiným buňkám. V souvislosti této práce je také důležitý protein MDMX, jelikož hladina v buňce je regulována alternativním sestřihem mRNA. V buňkách melanomu má MDMX obvykle zásadní podíl na umlčení aktivity p53. Protein PARP1 se účastní opravy poškození DNA, ale také může regulovat alternativní sestřih mRNA. V současné době se v léčbě již používají některé inhibitory PARP. Úkolem této práce bylo zjistit, zda mohou inhibitory PARP ovlivnit aktivitu p53, prostřednictvím regulace exprese a alternativního sestřihu mRNA pro MDMX. Výstupem mé práce bylo zjištění, že protein PARP1 pravděpodobně o regulaci alternativního sestřihu mRNA pro MDMX v buňkách melanomu nehraje zásadní roli.

Klíčová slova

p53; PARP1; maligní melanom; alternativní sestřih

Annotation

In this thesis I focused on tumor suppressor p53 activity in malignant melanoma and the effect of PARP inhibitors. The p53 protein has a major role in inhibiting cell proliferation in response to DNA damage. When irreversible cell damage occurs, p53 can activate apoptosis. Tumor cells have decreased p53 activity and programmed death in response to DNA damage does not occur, allowing further cell division and the transfer of mutations and damage to daughter cells. Also important in this work is the MDMX protein, a critical negative regulator of p53 activity in melanoma. The cellular levels of MDMX are often regulated by alternative splicing of mRNA. Parp1 participates in the repair of damaged DNA but can also regulate the alternative splicing of mRNAs. PARP inhibitors are already used in cancer therapy. The aim of this work was to find out whatever PARP inhibitors could affect p53 activity, by regulating the expression and alternative mRNA splicing for MDMX. The outcome of my work was the finding that PARP1 probably does not play essential role in the regulation of MDMX mRNA alternative splicing and p53 activity in melanoma cells.

Keywords

p53; PARP-1; malignant melanoma; alternative splicing

Seznam zkratek

APS	ammonium persulfate (peroxodisíran amonný)
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
AURK	aurora-related kinase
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
BRAF	serine-threonine kinase (proteinkináza B-Raf)
BRCA1	breast cancer gene 1 (tumor supresorový gen <i>BRCA1</i>)
BRCA2	breast cancer gene 2 (tumor supresorový gen <i>BRCA2</i>)
CDK	cyclin-dependent kinases [cyklin-dependentní kináza (původně Cdc2)]
CLK	Cdc2-like kinase (kináza typu Cdc2)
CNS	centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
DBD	DNA-binding domain (DNA-vazebná doména)
DDR	DNA damage response (odpověď buňky na poškození DNA)
DMSO	dimethyl sulfoxide (dimethylsulfoxid)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
ECL	enhanced chemiluminiscence (roztok pro posílení chemiluminiscence)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
ERK	extracellular signal-regulated kinases (kináza regulovaná extracelulárním signálem)
LAR	luciferase assay reagent (činidlo pro luciferázový test)
M	metastastases (metastázy)

MDM2	MDM2 proto-oncogene (protoonkogen MDM2)
mRNA	messenger RNA (messengerová RNA)
N	nodul (uzlina)
NES	nuclear export signal (jaderný exportní signál)
NLS	basic nuclear location sequence (základní jaderný lokalizační signál)
NoLS	human nucleolar localization sequences (lidské nukleolární lokalizační sekvence)
NRAS	neuroblastoma RAS
OD	C-terminal homooligomerization domain (C-koncová homooligomerizační doména)
Opti-MEM	Opti-Minimal Essential Medium (opti-minimální esenciální médium)
PAR	chains of poly-ADP-ribose (polymerní řetězce PARP)
PARG	poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARP glykohydrolázy)
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PARylace	self-poly-ADP-rybosylation (autopolyADP-rybosylace)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen (proliferační jaderný antigen)
PFA	paraformaldehyde (paraformaldehyd)
pre-mRNA	primary transcript mRNA (primární transkript mRNA)
PVDF	polyvinylidene fluoride (polyvinylidenfluorid)
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma (serin/treoninová kináza)
RAS	rat sarcoma
RING	really interesting gene (proteinové domény)

RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	sodium dodecyl sulphate (dodecylsírán sodný)
siRNA	small interfering RNA (malá interferující RNA)
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza)
Ser	serin
snRNA	small nuclear RNA (malé jaderné RNA)
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein (malé jaderné ribonukleoproteiny)
SR	členové rodiny serinu/argininu
T	tumor (nádor)
TAD	topologically associating domain (N-koncová transkripčně aktivační doména)
TBS	TRIS-buffered saline (pufr s obsahem Tris)
TEMED	tetramethylethylendiamin
TNM	tumor, node, metastasis (klasifikace nádorů)
TP53	tumor suppressor gene 53 (tumor supresorový gen kódující protein p53)
TRIS	tris(hydrosymethyl)aminomethane [tris(hydrosymethyl)aminomethan]
γ -H2AX	histon H2AX fosforylovaný na Ser139
UV	ultraviolet (ultrafialové záření)

OBSAH

ÚVOD	12
CÍLE PRÁCE.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1 HISTORIE	13
1.2 ÚVOD DO ONKOLOGIE	13
1.2.1 ZÁKLADNÍ ZNAKY NÁDOROVÝCH BUNĚK	13
1.2.2 KANCEROGENEZE	15
1.2.3 KLASIFIKACE NÁDORŮ	15
1.2.4 RIZIKOVÉ FAKTORY.....	16
1.3 BUNĚČNÝ CYKLUS.....	16
1.4 APOPTÓZA.....	17
1.5 MELANOM.....	17
1.5.1 FORMY MALIGNÍHO MELANOMU	18
1.5.2 LÉČBA MELANOMU.....	19
1.5.3 VÝSKYT MELANOMU VE SVĚTĚ.....	20
1.6 PROTEIN P53.....	20
1.7 PROTEIN MDM2.....	21
1.7.1 REGULACE AKTIVITY A STABILITY P53.....	22
1.8 PROTEIN MDMX.....	23
1.9 PROTEIN PARP1	23
1.10 ALTERNATIVNÍ SESTŘIH	24
2 METODY	26

2.1	POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE	26
2.2	SLOŽENÍ POUŽITÝCH ROZTOKŮ	26
2.3	TESTOVANÉ LÁTKY	28
2.4	KULTIVACE BUNĚK	29
2.5	WESTERN BLOT	29
2.5.1	PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ	29
2.5.2	SDS-PAGE (POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA)	30
2.5.3	SEMI-DRY BLOTTING (WESTERNOVÝ PŘENOS)	30
2.5.4	DETEKCE PROTEINŮ	30
2.6	IMUNOFLUORESCENCE	31
2.6.1	FIXACE A PERMEABILIZACE	32
2.6.2	BLOKOVÁNÍ	32
2.7	STANOVENÍ TRANSKRIPČNÍ AKTIVITY PROTEINU P53	32
2.7.1	MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY	32
2.7.2	STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ	33
2.8	TRANSFEKCE SIRNA	33
3	VÝSLEDKY	35
4	DISKUZE	44
5	ZÁVĚR	44
6	POUŽITÁ LITERATURA	45
7	SEZNAM OBRÁZKŮ	49
8	SEZNAM TABULEK	49
9	SEZNAM GRAFŮ	49

ÚVOD

Zhoubné nádory představují velmi vážná onemocnění a patří mezi nejčastější příčiny úmrtí. V České republice podle statistiky tato onemocnění postihnou každého třetího člověka a každý čtvrtý v jejich důsledku zemře. Onkologické problémy se mohou objevit u dospělé osoby i u dítěte, ale s rostoucím věkem pravděpodobnost výskytu nádoru roste. Maligní melanom patří mezi nejagresivnější nádorová onemocnění. Jeho počáteční stádia lze poměrně úspěšně léčit, ale v mnoha případech je nádor diagnostikován pozdě a při následné léčbě často na radioterapii ani chemoterapii neodpovídá.

Do výzkumu nádorových onemocnění je investováno mnoho času a finančních prostředků. Vědecké studie vedly ke zjištění, že ve většině nádorů byl vyřazen nádorový supresor p53, který má za úkol aktivovat apoptózu, jakmile dojde k nezvratnému poškození DNA. Příčinou jeho deaktivace v buňkách melanomu je zvýšená hladina proteinu MDMX, jež je často způsobena změnou v alternativním sestřihu mRNA transkriptu pro MDMX. Při opravách poškozené DNA je velmi důležitý protein PARP1, kterému se v současnosti věnuje velká pozornost a jeho inhibice pomocí nízkomolekulárních inhibitorů je klinicky testována jako terapie některých typů nádorů. V současnosti se při léčbě používají inhibitory PARP: olaparib, rucaparib a niraparib. Na základě výsledků nedávných studií se vědci domnívají, že se PARP1 může podílet i na regulaci alternativního sestřihu.

CÍLE PRÁCE

- analyzovat význam PARP1 pro regulaci alternativního sestřihu mRNA pro MDMX
- otestovat možnost ovlivnění exprese MDMX v buňkách melanomu pomocí inhibitorů PARP
- otestovat možnost ovlivnění aktivity p53 v buňkách melanomu pomocí inhibitorů PARP

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 HISTORIE

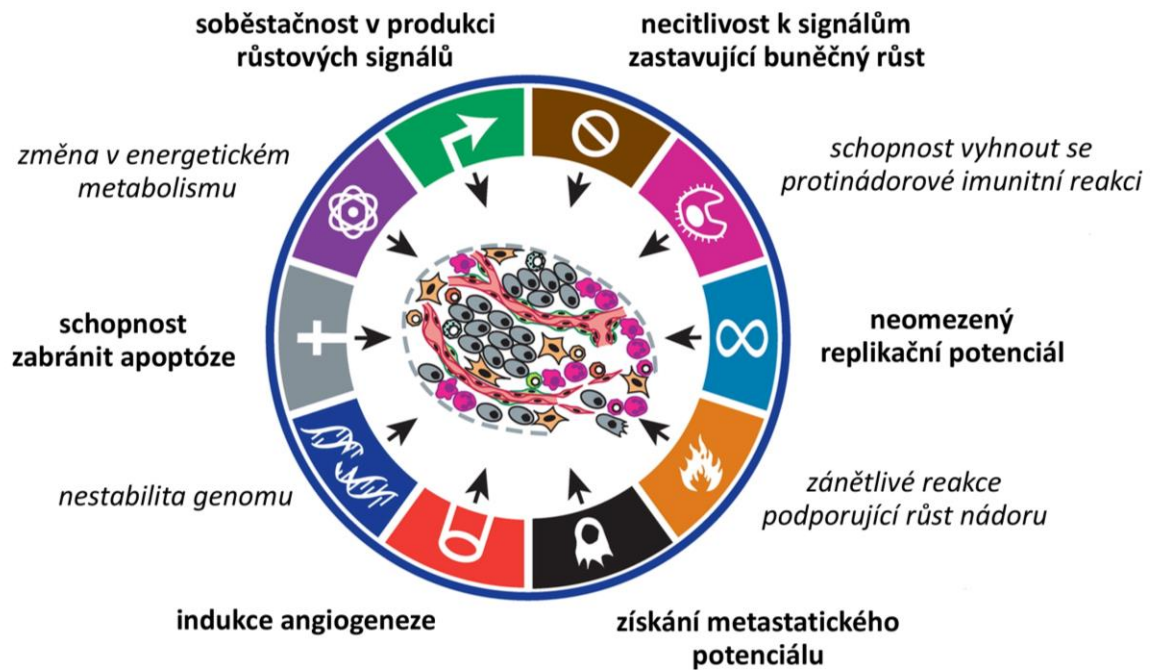
S onkologickými problémy se nesetkáváme pouze v moderní době. Náznaky nádorových onemocnění byly objeveny u některých kosterních pozůstatků a mumií. Za jeden z nejstarších dochovaných záznamů o tomto onemocnění můžeme považovat papyrus z roku až 3 000 let před Kristem, na kterém je záznam odpovídající popisu rakoviny prsu, žaludku a maligního lymfomu. O nádorovém onemocnění můžeme nalézt zmínky také v klínovém písmu na hliněných destičkách ze starověké Mezopotámie. Touto chorobou se v pozdější době zabýval také Hippokrates, který kolem roku 400 př. n. l. jako první použil termíny „karcinom“ a „tumor“, a dále Galén, který prohloubil znalosti o tomto onemocnění tím, že se zmínil o rozdílu mezi počátečním a pokročilým stadiem rakoviny. Onkologickým problémům se také věnoval ve stejné době Leonidas, který se proslavil chirurgickou léčbou počátečního stadia rakoviny prsu. O rakovině máme záznamy nejen od lékařů, ale i od malířů, mezi které patří Rembrandt a Raffael, kteří znázornili rakovinu prsu, a Goya, v jehož díle je zachycen melanom [1, 2, 4, 6].

1.2 ÚVOD DO ONKOLOGIE

Pod pojmem nádorové onemocnění se neskrývá pouze jedna určitá choroba, ale jedná se o nemoci v jejichž průběhu vzniká nádor. Zhoubný nádor je soubor buněk, které se nekontrolovatelně množí a šíří se. Jeho základními znaky jsou zvýšená proliferace a omezená apoptóza, což je zapříčiněno dědičným nebo získaným poškozením či mutacemi genů, kódující různé důležité proteiny. Může se jednat buď o proteiny, které zajišťují opravu DNA (geny s reparační funkcí, tumor supresorové geny), buněčné dělení (protoonkogeny, z nichž se po mutaci stanou onkogeny) či apoptózu (tumor supresorové geny). Tyto mutace jsou poté předávány dceřiným buňkám, u kterých může dojít k dalším mutacím [3, 4].

1.2.1 ZÁKLADNÍ ZNAKY NÁDOROVÝCH BUNĚK

Nádorové buňky mají mnoho znaků, kterými se liší od normálních buněk. Douglas Hanahan a Robert Weinberg napsali článek „Hallmarks of Cancer“, který byl roku 2 000 zveřejněn v časopisu Cell, a poprvé zde popsali základní charakteristické znaky nádorových buněk. Další charakteristické vlastnosti nádorů byly přidány v roce 2011 v článku „Hallmarks of cancer: The next generation“ (obr. 1) [27].



Obrázek 1 *Charakteristické znaky nádorových buněk podle Douglase Hanahana a Roberta Weinberga. Tučně je vyznačeno prvních šest charakteristických znaků a kurzívou jsou znázorněny znaky, které byly přidány v roce 2011 [27], převzato a upraveno*

Necitlivost k signálům zastavující buněčný růst: Na rozdíl od zdravých buněk, které mají signály podporující růst a potlačující dělení vyrovnané, nádorové buňky na tyto signály nejsou schopné správně reagovat. Tato necitlivost je jedním z příčin nekontrolovatelného růstu [27].

Neomezený replikační potenciál: Konce chromozomů u zdravé buňky jsou chráněny telomery – opakující se sekvence nukleotidů, jejichž délka se při každém buněčném dělení zmenší. Jakmile jsou telomery příliš krátké, buněčné dělení se zastaví. Tyto ztracené nukleotidy však mohou být obnoveny pomocí enzymu telomerázy – ribonukleoproteinového komplexu, jehož aktivita je u zdravých buněk nízká. Nádorové buňky se mohou na rozdíl od zdravých buněk dělit neomezeně. Příčinou je právě vysoká aktivita telomerázy [27].

Získání metastatického potenciálu: Nádorové buňky se mohou šířit do vzdálenějších míst v organismu pomocí krevních a lymfatických cest. Výsledkem metastazování může být vznik sekundárních nádorů – metastáz [27].

Indukce angiogeneze: V nádorových buňkách je snížena funkce signálů, které zajišťují inhibici růstu cév a zároveň dochází k vyšší aktivitě signálů podporující růst cév. Aby buňky zabránily nedostatku živin a hypoxii, je angiogeneze spuštěna už u malého nádoru. Na rozdíl od fyziologické angiogeneze trvá nádorová angiogeneze neustále [27].

Schopnost zabránit apoptóze: Jakmile dojde k poškození buňky a její poruchy a mutace nemohou být opraveny, nastane u zdravých buněk programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Tímto procesem se zajistí, aby se chybná genetická informace nepřenesla na buňky dceřiné. Významnou úlohu zde má nádorový supresorový protein p53. Nádorové buňky mají funkci tohoto proteinu sniženu nebo protein p53 nefunguje vůbec, což neumožňuje poškozeným buňkám účinně spustit apoptózu a mohou pokračovat v buněčném dělení [27].

Soběstačnost v produkci růstových signálů: Zdravé buňky aktivují signální dráhy podporující růst buněk pouze v určitých momentech tak, aby zajistily homeostázu jejich počtu. Nádorové buňky mají však tuto schopnost deregulovanou. Jsou schopné produkovat ligandy receptorů růstových faktorů a následně na ně reagovat, což způsobí konstantní autokrinní proliferativní stimulaci. Také může být zvýšena hladina receptorových proteinů, což způsobí zvýšenou citlivost na menší množství ligandu růstového faktoru. Existuje však mnoho dalších možností, kterými nádorová buňka dosáhne této soběstačnosti [27].

1.2.2 KANCEROGENEZE

V průběhu kancerogeneze obvykle proběhne celkem pět etap. Nejprve nastane iniciace, která spustí proces maligní transformace v důsledku zevních či vnitřních faktorů. Po působení dalších podnětů dochází k promoci, kdy se může proces ještě zastavit. V opačném případě následuje konverze neboli transformace, v jejímž průběhu vzniká maligní klon. Následuje progresse, kdy dochází k růstu nádoru a buňka neodpovídá na regulační mechanismy, a nakonec se nádor začne šířit do ostatních tkání. Tuto etapu nazýváme metastazování [6].

1.2.3 KLASIFIKACE NÁDORŮ

Nádory rozdělujeme podle jejich vlastností na maligní a benigní. Na rozdíl od benigního je maligní nádor agresivnější, prorůstá do okolních tkání a pomocí krevních a lymfatických cest se šíří do ostatních částí organismu, kde může vzniknout nový, tzv. sekundární nádor neboli metastáza [4].

Aby lékaři mohli zvolit nejúčinnější variantu léčby, je nezbytné stanovit co nejpřesnější diagnózu. Proto byla zavedena klasifikace TNM (staging), která pomáhá určit rozsah a stádium onemocnění pomocí rozsahu prvotního ložiska, stavu uzlin a případného metastazování. Kategorie T (tumor) vyjadřuje rozsah nádoru, který je udán v centimetrech. Kategorie N (noduli) informuje o postižení uzlin. Kategorie M (metastases) popisuje, zda existují metastázy [6].

1.2.4 RIZIKOVÉ FAKTORY

Existují tzv. rizikové faktory, které na buňky našeho těla působí denně a zvyšují pravděpodobnost vzniku rakoviny. Některé tyto faktory můžeme z části ovlivnit. Rozdělujeme je tedy na ovlivnitelné a neovlivnitelné faktory [5].

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory zařazujeme: kouření, nadměrnou konzumaci alkoholu, nedostatek pohybové aktivity, výživové faktory, infekce, UV záření a stres. Mezi neovlivnitelné faktory řadíme např. dědičnost, věk a rasu [5].

1.3 BUNĚČNÝ CYKLUS

Průběh buněčného cyklu je řízen chemickými signály a správné fungování a přechody mezi jednotlivými fázemi zajišťují tzv. kontrolní body. Normální buňky se tedy množí kontrolovaným způsobem. Nádorové buňky ale v průběhu buněčného cyklu nereagují správně na chemické signály, a proto rostou neregulovatelně [7].

K rozdělení buněk dojde po skončení buněčného cyklu, který je tvořen čtyřmi fázemi – G₁ (z anglického slova gap), S (syntéza), G₂ a M (mitóza). První tři fáze, G₁, S a G₂, jsou nazývány interfáze a M-fáze zahrnuje mitózu a cytokinezi [3, 8].

Po vzniku nových dceřiných buněk nastává interfáze, která začíná G₁ fází, kde se nachází dva kontrolní body. První zajišťuje, aby buňka dorostla do požadované velikosti, a druhý kontrolní bod kontroluje buněčné prostředí a je zde popřípadě prostor k opravám DNA. Následuje S-fáze, kde buňka replikuje svou DNA a zároveň se zde nachází další kontrolní bod, který replikaci kontroluje. Poté přechází do G₂ fáze, kde se buňka připravuje na mitózu a zároveň kontroluje množství a strukturu DNA a správné uspořádání dělicího vřeténka. V průběhu M-fáze probíhá nejprve mitóza, která zajišťuje dělení jádra, a poté následuje cytokineze, kde dojde k fyzickému rozdělení buňky na dvě dceřiné [3, 7].

Regulace buněčného cyklu je velmi důležitá, a právě tuto úlohu zajišťují proteiny zvané cykliny a enzymy zvané cyklin-dependentní kinázy (CDK). Jejich komplexy umožňují přechod mezi jednotlivými fázemi tím, že přenesou fosfátovou skupinu na další regulační proteiny. Na regulaci buněčného cyklu se také podílí inhibitory CDK, mezi které patří např. protein p16 a p21 [3, 4].

1.4 APOPTÓZA

Vedle buněčného dělení je pro organismus také velmi důležitá apoptóza, která slouží k eliminaci poškozených buněk. V okamžiku, kdy buňka zjistí poškození, které již nelze opravit, se spustí apoptóza. Tím se zabrání většímu poškození a přenosu mutací do dalších generací. V průběhu apoptózy mají hlavní roli proteolytické enzymy, nazývané kaspázy, které po své aktivaci cíleně odstraňují proteiny, které jsou pro přežití buňky klíčové, a poté následuje smrt buňky. Signály, které zajišťují programovanou smrt buňky dělíme na vnější a vnitřní apoptotickou dráhu [7].

1.5 MELANOM

Na vzniku melanomu se podílí jak genetické, tak rizikové faktory zevního prostředí, kam patří především UV záření. Do rizikové skupiny patří především lidé, kteří se špatně opalují, mají světlou kůži se sklonem k tvorbě pih a lidé s rezavými, či světlými vlasy. Dále je rizikový výskyt atypických névů, vysoká četnost melanocytárních névů a genetická predispozice [2].

Maligní melanom, rychle rostoucí a metastazující nádor, vzniká z transformace melanocytů, které můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou epidermální melanocyty, z jejichž přeměny vznikají nádory kůže z 95 % a sliznic z 1 % všech melanomů. Druhou skupinou jsou melanocyty jiného typu než epidermálního. Melanomy vzniklé z toho typu, uveální melanomy a primární melanomy centrální nervové soustavy, představují 4 % melanomu. Obecně však není vznik nádoru způsoben pouze jednou mutací genu, ale jedná se o skupinu mutací. V případě melanomu se nejčastěji jedná o mutace onkogenů, kam patří např. geny NRAS, BRAF, MDM2 a AURK, kódující p53, nebo mutace nádorových supresorových genů, mezi které můžeme zařadit např. TP53 [7].

Metastazování u melanomů je velmi časté a metastázy se mohou objevit ve všech tkáních a orgánech. Mezi nejčastější lokace patří kůže a podkoží, kde se metastázy vyskytují okolo 45-55 %, dále se jedná o lymfatické uzliny, plíce, játra, CNS a kosti. Metastázy dělíme na lokální

recidivy melanomu, lokální a lokoregionální kožní metastázy, regionální uzlinové metastázy a vzdálené metastázy [2].

1.5.1 FORMY MALIGNÍHO MELANOMU

Melanom se nevyskytuje pouze na kůži, ale může postihnout také sliznice či oko. Vzhledem k lokaci nádoru rozdělujeme melanom na formu okulární, slizniční a kožní. Kožní forma melanomu je u bělošské populace nejčastější a dle klinicko-histologického hlediska jej můžeme dále dělit na: lentigo maligna melanom, superficiálně se šířící melanom, nodulární melanom, akrolentiginózní melanom, desmoplastický melanom a na amelanotické formy [6].

Ačkoliv melanom patří mezi nádory, u kterých lze počáteční stádia odhalit včas, často je diagnostikováno až pokročilé onemocnění. Mnoho pacientů nevěnuje pozornost příznakům, které naznačují vznik kožního nádoru, či mají strach z odborného vyšetření. Pro zdravotníky i veřejnost bylo zavedeno pravidlo ABCDE, které pomáhá určovat, zda se jedná o benigní či maligní pigmentové ložisko [2].

Tabulka 1 *ABCDE charakteristika melanomu a névů* [2], převzato a upraveno

	Běžné získané névy	Dysplastické névy	Melanom
A – tvar	symetrický	asymetrický	asymetrický
B – okraje	pravidelně	nepravidelně	nepravidelně
C – barva	uniformní	skvrnitá	skvrnitá
D – velikost	2-10 mm	> 10 mm	> 10 mm
E – vývoj	pouze dočasně symetrické zvětšování	pouze dočasně	vždy a trvale ABCD

Lentigo maligna melanom je obvykle tmavá plocha, jejíž růst je velmi pomalý. Nejčastěji postihuje lidi po 55. roce a vyskytuje se především v oblasti hlavy. Superficiálně se šířící melanom je nejčastěji plochou skvrnou s nepravidelnou pigmentací, pomalým růstem a představuje nejčastější typ melanomu. Nodulární melanom velmi často metastazuje a neodpovídá rysům, které jsou typické pro ABCD. Akrolentiginózní melanom je často chybně

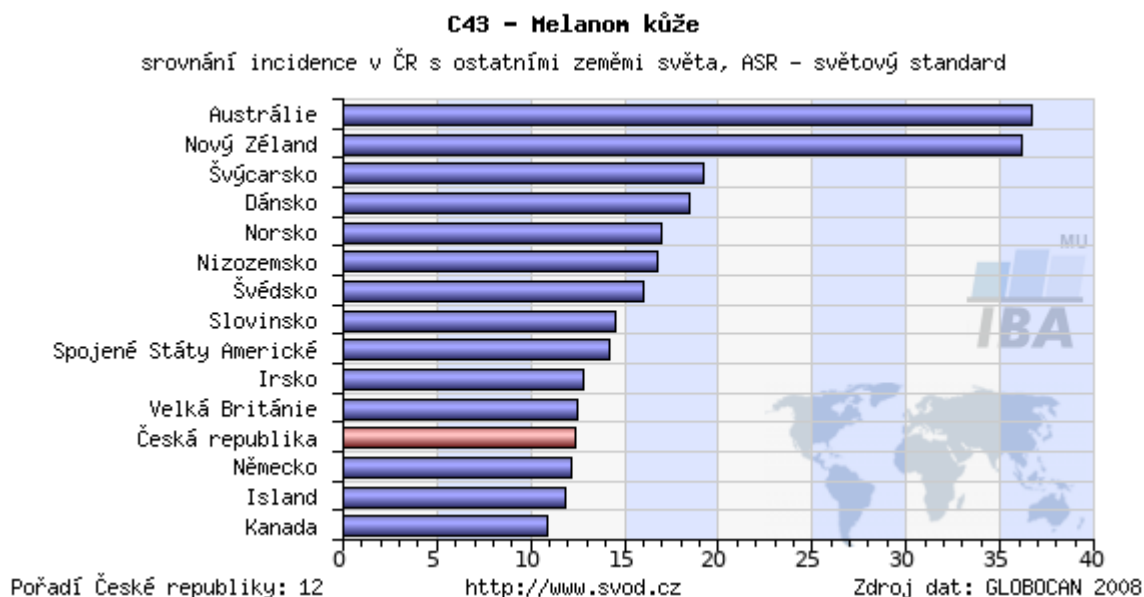
diagnostikován, kvůli záměně za subungvální hematom. Nejčastěji se objevuje na ploskách a dlaních. Desmoplastický melanom může vypadat jako pigmentovaná jizva a tato forma melanomu se řadí mezi vzácné a vyskytuje se především na hlavě, krku a v horní části zad. Amelanotické formy jsou velmi špatně diagnostikovatelné [6].

1.5.2 LÉČBA MELANOMU

Prvotní a nejspolehlivější metodou při léčbě melanomu je včasné zjištění počátečního stadia a následně chirurgické odstranění nádoru. Ke zlepšení prognózy dojde také po odstranění regionálních uzlin, což je zákrok, který je spojen s chirurgickou léčbou a provádí se, pokud jsou tyto uzliny postižené a zároveň nedošlo k metastazování do vzdálených míst [6].

Jakmile se nepodaří nádor zachytit včas a melanom je již v pokročilém stadiu, jeho léčba je složitá. V tomto případě se často využívá radioterapie, chemoterapie, jejichž výsledky jsou ale omezené. Melanom patří mezi nádory s vysokou radiorezistencí, a proto se radioterapie využívá především k redukci vzdálených metastáz. Melanom má také malou citlivost na chemoterapii a nejúčinnější cytostatika dosahují úspěchu v odpovědi na léčbu pouze v 15–20 %. V poslední době je s úspěchem testována imunoterapie a také léčiva cílící na signální dráhu kinázy ERK aktivovanou mutacemi onkogenů NRAS a BRAF [6].

1.5.3 VÝSKYT MELANOMU VE SVĚTĚ



Obrázek 2 Porovnání výskytu melanomu ve světě [9], převzato a upraveno

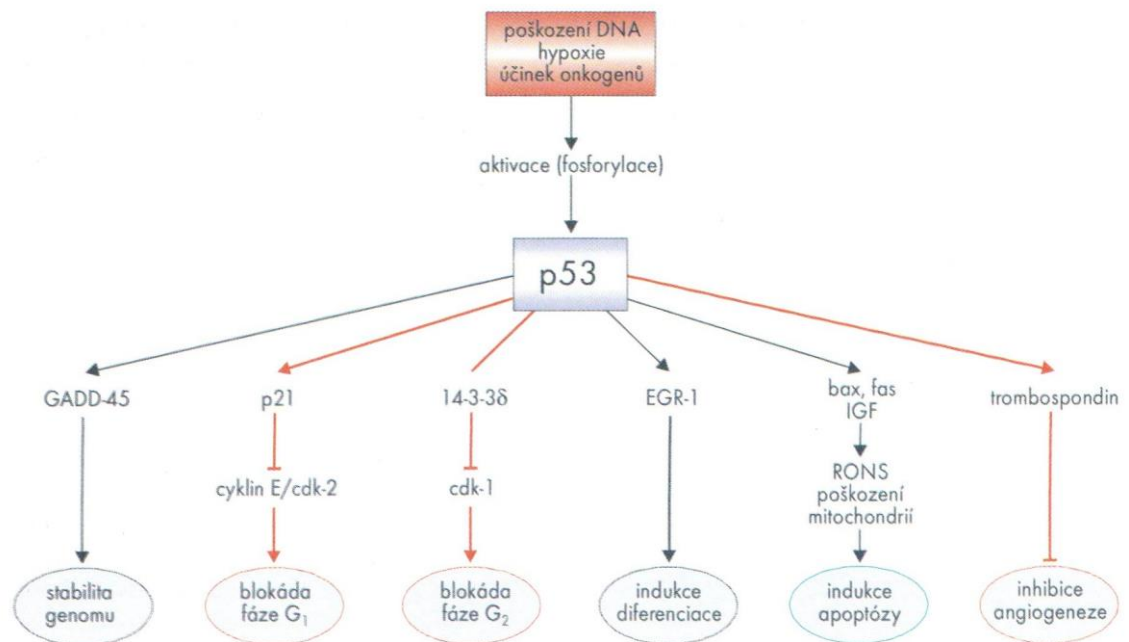
Graf byl aktualizován roku 2019 a znázorňuje pořadí států s nejvyšším počtem výskytu melanomu. Česká republika je v současné době na 12. místě tohoto seznamu.

1.6 PROTEIN p53

Jednou z nejčastějších změn umožňujících vzniku nádorů je snížená aktivita p53. Jedná se o nádorový supresorový protein o velikosti 53 kDa, který je kódován genem *TP53* a umístěn na krátkém raménku chromozomu 17. Skládá se ze 393 aminokyselin a ze tří hlavních funkčních domén. První doménou je N-koncová transkripčně aktivační doména (TAD), druhou doménou je centrální DNA-vazebná doména (DBD) a třetí je C-koncová homooligomerizační doména (OD). Nejčastěji na N-koncové a C-koncové doméně dochází k posttranslačním modifikacím, regulujícím funkci p53. Na TAD dochází hlavně k fosforylaci a na OD probíhá acetylace, metylace, fosforylace a připojení proteinů ubikvitinu. V DBD buňka nejčastěji podléhá mutacím, které inaktivují p53 [3, 7, 10, 11].

Signální dráha p53 odpovídá na vnitřní i vnější stresové signály, mezi které řadíme například nedostatek živin, zkrácení telomer, poškození dělicího vřeténka, poškození DNA a mnoho dalších signálů. Detekce a interpretace tohoto signálu je zajištěna enzymy, které mají schopnost inhibovat negativní regulátory proteinu p53, a také zvyšují jeho transkripční vlastnosti a stabilitu díky posttranslačním modifikacím [12, 13, 14].

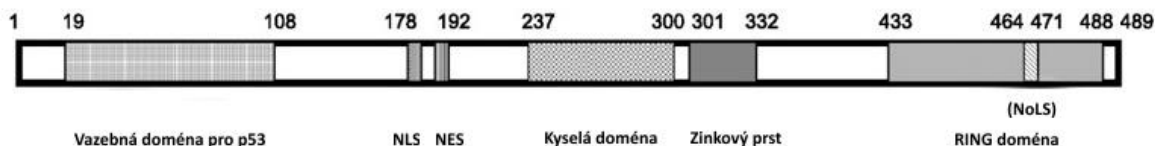
Ve zdravých buňkách je hladina p53 nízká a tento protein se váže na protein MDM2, který indukuje degradaci p53. Jakmile je buňka vystavena stresu a dojde k poškození její DNA, hladina p53 rychle vzroste a přejde do aktivní formy. Buněčný cyklus se zastaví a aktivovaný protein p53 uvede do činnosti geny, které se podílí na opravě DNA. Pokud oprava DNA již není možná, p53 aktivuje skupinu genů, které spustí apoptózu. Signální dráha p53 kontroluje zejména vnitřní, mitochondriální dráhu indukce apoptózy. Pokud dojde ke snížení či absenci p53, buňka má omezenou schopnost opravit poškození DNA. Tento nedostatek či absence funkčního proteinu p53 v nádorech je obecně nejčastěji způsoben mutací genu *TP53* [3, 7, 10].



Obrázek 3 *Funkce proteinu p53* [6].

1.7 PROTEIN MDM2

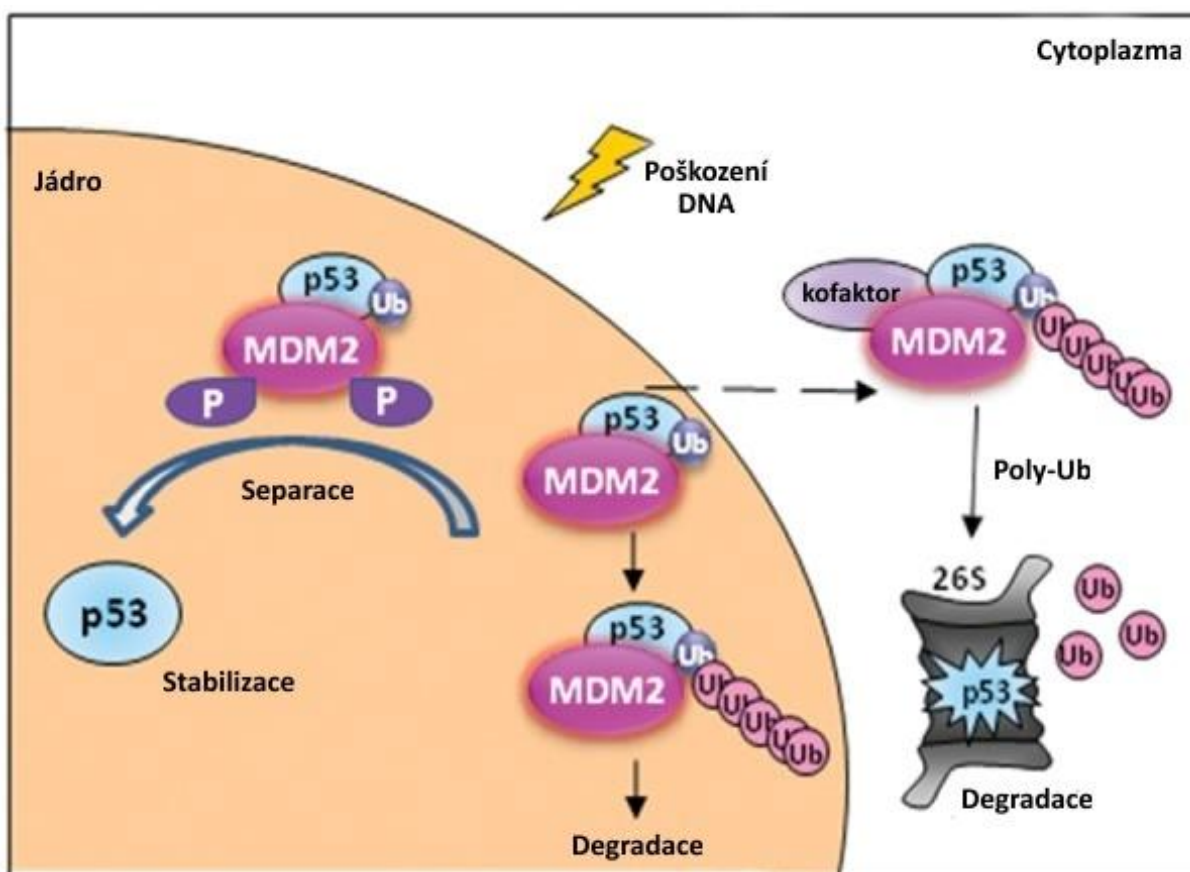
MDM2 má mnoho různých izoforem o různé délce vznikajících jako důsledek alternativního sestřihu. Protein MDM2 se řadí mezi onkoproteiny a funguje jako ubikvitin ligáza pro p53 a další cíle. Skládá se z několika domén: vazebná doména pro p53, kyselá doména, zinkový prst, doména RING a sekvence, které slouží k regulaci subcelulární lokace NLS, NES a NoLS. Gen *MDM2* obsahuje dvanáct exonů a jeho transkripce je řízena dvěma promotory. Prvním promotorem je P1, který se nachází před exonem 1, a druhý promotor P2 zajišťuje interakci s p53. Transkripce *MDM2* je tak regulována proteinem p53 a spolu tvoří autoregulační smyčku. Funkce MDM2 je při kontrole buněčného růstu velmi důležitá, protože se jedná o hlavní negativní regulátor nádorového supresoru p53 [15, 16, 17].



Obrázek 4 *Struktura proteinu MDM2* [15]. převzato a upraveno

1.7.1 REGULACE AKTIVITY A STABILITY p53

Expres nebo transkripční aktivita p53 může být potlačena pomocí MDM2 třemi způsoby. Prvním způsobem je vazba MDM2 na N-koncovou doménu proteinu p53, a tím dochází k inhibici schopnosti p53 transaktivovat cílové geny. Druhou možností je degradace p53 v důsledku označení ubikvitinem. MDM2 může způsobit mono- nebo polyubikvitylaci p53. O způsobu ubikvitylace p53 rozhoduje množství MDM2 v buňce. Monoubikvitylace p53 může způsobit jeho transport z jádra do cytoplazmy, a tím také negativně ovlivnit jeho transkripční aktivitu [18, 19, 20].



Obrázek 5 *Regulace p53 proteinem MDM2* [20], převzato a upraveno

1.8 PROTEIN MDMX

Protein MDMX, také znám jako MDM4, je velmi podobný MDM2. Stejně jako MDM2 obsahuje vazebnou doménu pro p53, kyselou doménu, zinkový prst a doménu RING. MDMX je regulátorem MDM2, kdy pomocí své domény RING inhibuje autoubikvitinaci a degradaci MDM2 a tím ho stabilizuje. Přestože jsou si tyto proteiny velice podobné, MDMX nemá ubikvitin ligázovou aktivitu, jako to je u MDM2. MDMX také řadíme mezi onkoproteiny a ve formě heterodimeru s MDM2 však může indukovat ubikvitinaci a degradaci p53. MDMX se sám o sobě nachází v cytoplazmě a jeho transport do jádra je zprostředkován vazbou MDM2. MDMX totiž neobsahuje sekvenci NLS, která by zajišťovala jeho lokalizaci do jádra. Transkripční aktivita p53 je potlačena díky vazbě N-terminální domény MDMX na N-konec p53. Tato inhibiční interakce funguje i když u p53 není detekována ubikvitinace, která by byla zajištěna MDMX. V buňkách melanomu je MDMX nejdůležitějším negativním regulátorem p53 [21, 22, 23, 24, 39].

1.9 PROTEIN PARP1

Nejvíce studovaným proteinem rodiny PARP (polymerázy poly(ADP-ribózy)) je PARP1, jehož velikost v lidských buňkách je 113 kDa a skládá se z N-koncové domény interagující s DNA, centrální automatizační domény a C-koncové katalytické domény. Díky jeho funkci při opravách DNA se inhibice PARP1 využívá při léčbě některých druhů rakoviny. Zatím jsou schváleny a používají se k této léčbě tyto inhibitory PARP – olaparib, rucaparib, niraparib [25, 26].

Rodina proteinů PARP má celkem 17 členů. Proteiny PARP byly rozděleny podle svých funkcí a struktur. Do skupiny DNA-dependentních PARP, patří PARP1, který je považován za nejvýznamnějšího člena této rodiny, PARP2 a PARP3. Tyto proteiny jsou aktivovány, jakmile dojde k poškození DNA. Při porušení DNA řetězce, začne PARP1 lokálně produkovat poly(ADP-ribózové) řetězce, které jsou důležité pro lokalizaci a uspořádání proteinů zajišťující opravu DNA, transkripčních faktorů a PAR-vazebných proteinů, které se vážou na DNA a RNA [25, 26].

Na buňky nepřetržitě působí řada faktorů, jejichž důsledkem je poškození integrity genomu. Následkem takového poškození může dojít ke zlomu v jednom či obou vláknech DNA. V takovém případě se buňka snaží v co nejkratším čase poruchy opravit. V tomto procesu je využíván mechanismus reakce na poškození DNA (DDR), k jehož aktivaci dojde v místě

zlomu. Zároveň se spuštěním DDR dojde k protein poly ADP-ribosylaci (PARylaci), jejímž následkem je změna struktury, biochemických vlastností a také funkcí modifikovaných proteinů. PARylace je katalyzována proteiny PARP, jedná se o posttranslační modifikaci proteinů, které se váží na poškozená místa DNA. Jakmile je poškození DNA opraveno, je zapotřebí, aby byla PARylace inaktivována. K tomuto procesu dojde nejčastěji pomocí enzymů PAR glykohydroláz (PARG) [28, 29, 30, 31, 32].

BRCA1 a *BRCA2* jsou tumor supresorové geny, které se podílejí na regulační homologní rekombinaci, což je mechanismus zajišťující opravu dvouvláknových zlomů DNA ve fázi S a G₂ buněčného cyklu. Jakmile v buňce s deaktivovanou funkcí proteinu BRCA1/2 dojde současně k inhibici PARP, počet jednovláknových zlomů DNA se bude zvyšovat. To může zapříčinit vznik dvouvláknových zlomů DNA v replikační vidlici, které by za normálních podmínek byly opraveny homologní rekombinací za účasti BRCA1/2. Inhibice PARP v buňkách s defektem v homologní opravě, zejména v buňkách s mutacemi genů *BRCA1/2*, jež jsou časté např. v nádorech prsu nebo vaječníků, vede ke genomové nestabilitě, jejímž následkem je apoptóza [33, 34, 35, 36].

1.10 ALTERNATIVNÍ SESTŘIH

Proces, kdy se genetická informace z DNA přenáší do RNA a následně do proteinu se nazývá genová exprese. Nejprve dojde k transkripci neboli přepisu, což je proces, kdy z molekuly DNA vznikne transkript v podobě komplementární pre-mRNA. Po oddělení transkriptu od DNA dojde u eukaryot k sestřihu a vznikne tak mRNA. Následuje translace neboli překlad, kdy se pomocí ribozomů podle mRNA syntetizuje protein. Na rozdíl od prokaryotických buněk, tedy u většiny genů eukaryot primární transkript neodpovídá mRNA. Jejich geny většinou obsahují nekódující sekvence nazývané introny, které se nachází mezi kódujícími sekvencemi tzv. exony [3].

Odstranění intronů a následné spojení exonů se nazývá sestřih. Tento proces je katalyzován spliceozomy, které jsou tvořeny komplexy malých molekul RNA (snRNA) a proteiny. Tyto komplexy nesou název snRNP (malé jaderné ribonukleoproteiny). SR proteiny mají v průběhu sestřihu významnou roli, kdy pomáhají rozpoznat místa sestřihu. Pokud v rámci sestřihu transkriptu dochází k různým variantám kombinování exonů a intronů a vzniká více variant mRNA, hovoříme o tzv. alternativním sestřihu. Nedávné objevy naznačují, že PARP1 se může podílet na regulaci alternativního sestřihu. U tohoto kontextu je zajímavé, že hladina MDMX

v buňkách melanomu je regulována alternativním sestřihem. Ve své práci jsem se proto zabývala možným vlivem PARP1 na regulaci hladiny MDMX v buňkách melanomu [3, 38, 40, 42].

2 METODY

V průběhu zpracování praktické části této práce jsem využila několik různých laboratorních postupů a metod. Jednalo se o western blot, imunofluorescenci, stanovení transkripční aktivity proteinu p53 pomocí luciferázové aktivity a transfekci siRNA. Pracovala jsem celkem se čtyřmi nádorovými buněčnými liniemi.

2.1 POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE

Tabulka 2 Použité buněčné linie [autor].

Buněčná linie	Morfologie	Vlastnosti	Typ	Věk	Pohlaví
A375	epitel	adherentní	maligní melanom	54	žena
Mel-Juso	epitel	adherentní	primární nádor melanomu	58	žena
MCF7	epitel	adherentní	adenokarcinom	69	žena
A375-p53-luc	buněčná linie A375 transfekovaná luciferázovým reportérovým konstruktem pGL4.38[luc2P/p53 RE/Hygro] (Promega)				

2.2 SLOŽENÍ POUŽITÝCH ROZTOKŮ

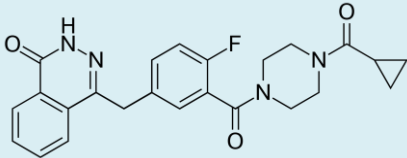
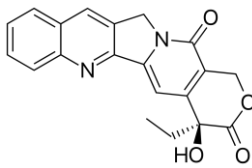
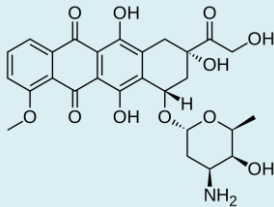
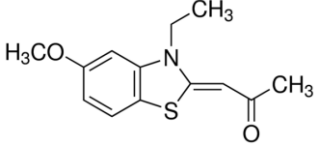
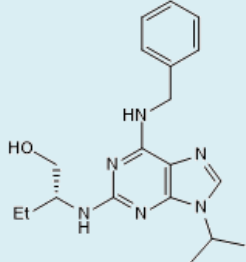
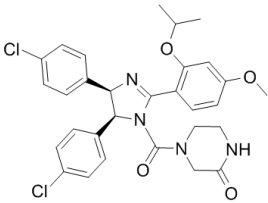
Tabulka 3 Složení použitých roztoků [autor].

Název roztoku	Složení	
PBS	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	2,31 g
	KH ₂ PO ₄	0,158 g
	H ₂ O	1 000 ml
TBS-Tween	2M Tris-HCl (pH = 7,4)	10 ml
	NaCl (100 mM)	11,79 g
	TWEEN (0,05%)	1 ml
	H ₂ O	2 l
Sample Buffer	1M Tris-HCl (pH = 6,8)	6,25 ml
	10% SDS	20 ml
	b-merkapt ethanol	5 ml
	glycerol	1 ml
	bromophenol blue	1 mg
	H ₂ O	17,75 ml

Název roztoku		Složení	
10% separační gel (2 gely)	H ₂ O		2, 7 ml
	1M Tris-HCl (pH = 8, 8)		2, 8 ml
	10% SDS		75 µl
	10% APS		20 µl
	TEMED		5 µl
	40% akrylamid		1, 88 ml
5% zaostřovací gel (2 gely)	H ₂ O		2, 8 ml
	1M Tris-HCl (pH = 6, 8)		469 µl
	10% SDS		37, 5 µl
	10% APS		18, 75 µl
	TEMED		3, 75 µl
	40% akrylamid		469,4 µl
10 × elektroforetický pufr	glycin		144, 2 g
	1M Tris-HCl		30, 3 g
	H ₂ O		1 000 ml
1 × elektroforetický pufr	10 × elektroforetický pufr		100 ml
	10% SDS		10 ml
	H ₂ O		890 ml
1 × přenosový pufr	10 × elektroforetický pufr		100 ml
	methanol		200 ml
	H ₂ O		700 ml
Roztok pro ECL (1:1)	roztok A	EDTA	100 µl
		kyselina p-kumarová	450 µl
		luminol	0,2 g
		1M Tris-HCl (pH = 9, 4)	100 ml
		4-jodofenylboritá kyselina	1 ml
	roztok B	EDTA	100 µl
		perboritan sodný	0, 123 g
		octan sodný (pH = 5)	100 ml

2.3 TESTOVANÉ LÁTKY

Tabulka 4 *Testované látky* [autor].

Název látky	Charakteristika	Chemická struktura
Olaparib	inhibitor PARP zdroj: SelleckChem (s1060) ředěno v DMSO použité koncentrace: 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 / 15 μM	
Camptothecin	inhibitor topoizomerázy zdroj: Sigma Aldrich (C9911) ředěno v DMSO použité koncentrace: 0,5 μM	
Doxorubicin	inhibitor topoizomerázy zdroj: Sigma Aldrich (44583) ředěno v DMSO použité koncentrace: 0,5 μM	
TG003	inhibitor CLK zdroj: doc. Mgr. Kamil Paruch, Ph.D. (Ústav chemie Přírodovědecké fakulty MU) ředěno v DMSO použité koncentrace: 25 μM	
Roscovitine	inhibitor CLK zdroj: Sigma Aldrich (R7772) ředěno v DMSO použité koncentrace: 20 μM	
Nutlin 3	inhibitor interakcí mezi MDM2 a p53 zdroj: Sigma Aldrich (N6287) ředěno v DMSO použité koncentrace: 10 μM	

2.4 KULTIVACE BUNĚK

Kultivace buněčných kultur probíhala ve sterilním inkubátoru, který zajišťoval stálou teplotu 37 °C, vysokou vzdušnou vlhkost a 5% CO₂. Kultivaci jsem prováděla v médiu RPMI-1640, které obsahovalo 100 IU/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 10 % fetálního hovězího séra a 2 mM L-glutaminu. Jakmile byly buňky v kultivační Petriho misce ze 70–80 % konfluentní, provedla jsem pasáž. Tento krok jsem opakovala 2x až 3x týdně v závislosti na rychlosti růstu buněk.

Nejprve jsem médium a Trypsin-EDTA zahřála na 37 °C. Poté jsem odsála staré médium a buňky promyla v PBS. Následně jsem uvolnila buňky ode dna misky za použití Trypsinu-EDTA. Po 3–5 minutách jsem přidala zahřáté médium, díky kterému jsem deaktivovala účinek Trypsinu-EDTA a část této suspenze jsem přidala do kultivační misky s novým médiem.

2.5 WESTERN BLOT

Pro detekci hladiny studovaných proteinů v buňce jsem nejprve připravila buněčné lyzáty. Proteiny obsažené v lyzátu jsem pomocí elektroforézy rozdělila v gelech podle jejich velikostí. Následně jsem je pomocí westernového přenosu přenesla na PVDF membrány, a poté je detekovala použitím primárních a sekundárních protilátek.

2.5.1 PŘÍPRAVA BUNĚČNÝCH LYZÁTŮ

Na kultivační destičku, nejčastěji 12jamkovou, jsem ve sterilním boxu nasadila buňky o koncentraci $1,5\text{--}2 \times 10^4$ buněk/ml. Nasazenou buněčnou linii jsem kultivovala 24 h ve sterilním boxu za běžných podmínek. Následující den jsem odsála staré médium, buňky jsem opatrně promyla v PBS, aby se neodlepily od povrchu misky, následně ho odsála a přidala médium s inhibitory o potřebné koncentraci. Kultivační destičku jsem opět vložila do sterilního inkubátoru, kde se buněčné linie za působení inhibitorů kultivovaly. Po uplynutí stanoveného času jsem vzorky lyzovala. Nejprve jsem odsála staré médium a buňky $1\text{--}2 \times$ opatrně promyla v PBS a následně ho odsála. K buňkám jsem přidala Sample Buffer (při práci s 12jamkovou kultivační destičkou jsem pipetovala 80–100 µl tohoto pufru) díky čemuž došlo k lyzi buněk. Lyzáty jsem následně pipetovala do mikrozkrumavek a inkubovala po dobu 15 min při teplotě 95 °C.

2.5.2 SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Dle návodu výrobce jsem sestrojila aparaturu Small Mighty SE250 (Hoefler) a připravila si roztok pro 10% polyakrylamidový separační gel, který jsem následně nalila do aparatury. Během 30–40 min gel polymerizoval a po uplynutí této doby jsem přidala roztok pro 5% zaostřovací gel, do nějž jsem vložila hřebínek a nechala gel polymerizovat dalších 15–20 min. Následně jsem aparaturu s gely přenesla do elektroforetické vany, do které jsem přidala 1× elektroforetický pufr a opatrně vyjmula hřebínek. Do první jamky jsem napipetovala referenční marker molekulové hmotnosti a do ostatních jamek lyzáty. Aparaturu jsem připojila do zdroje napětí, na kterém jsem nastavila výchozí hodnotu 60 V. V okamžiku, kdy proteiny markeru překročily hranici zaostřovacího a separačního gelu, začala jsem pomalu zvyšovat napětí až do 100 V. Detekované proteiny se v gelu rozdělily dle jejich relativní molekulové hmotnosti.

2.5.3 SEMI-DRY BLOTTING (WESTERNOVÝ PŘENOS)

Před koncem elektroforézy jsem aktivovala PVDF membrány v methanolu a společně s filtračním papírem jsem je vložila do vychlazeného roztoku přenosového pufru. Po ukončení elektroforézy jsem z aparatury vyjmula gely, které jsem s membránami a filtračním papírem vkládala do přístroje Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer cell (BioRad), který slouží pro přenos proteinů z gelů na membrány. Do aparatury jsem nejprve vložila jeden filtrační papír, na který jsem položila membrány tak, aby se navzájem nedotýkaly. Na ně jsem opatrně přenesla gely a překryla je druhým filtračním papírem. Následně jsem odstranila všechny bubliny, které mezi jednotlivými vrstvami vznikly. Aparaturu jsem zavřela pomocí víka a připojila do zdroje napětí. Nastavení proudu jsem volila podle počtu vložených gelů. Na jednu membránu odpovídalo nastavení o konstantním proudu 0,11 A na 1 h 20 min.

2.5.4 DETEKCE PROTEINŮ

Zatímco probíhal westernový přenos, připravila jsem si roztok 5% odtučněného sušeného mléka zředěného v TBS-Tween (dále jen 5% mléko). Po ukončení westernového přenosu jsem inkubovala membrány v 5% mléce po dobu 1 h při pokojové teplotě na třepačce, čímž docházelo k blokování membrány proti nespecifické vazbě protilátek. Poté jsem membrány rozřezala dle velikosti detekovaných proteinů a na každou část membrány jsem nanesla příslušnou primární protilátku a nechala ji přes noc působit při 4 °C. Druhý den jsem membrány nejprve promyla 5 × 7 min v TBS-Tween a poté jsem aplikovala sekundární protilátky, které

byly inkubovány 1 h. Po ukončení inkubace jsem membrány opět promyla 5×7 min v TBS-Tween. Na jednotlivé membrány jsem nanesla roztok pro ECL a následně v G:Boxu Chemi XRQ (Syngene) signál detekovala.

Tabulka 5 Použité primární protilátky [autor].

Detekovaný protein	Katalogové číslo	Zdroj	Velikost proteinu	Původ	Ředění	
PCNA (klon P-10)		RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc., MOÚ, Brno	37 kDa	myš	1:50	mléko
p53 (klon DO-1)		RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc., MOÚ, Brno	53 kDa	myš	1:50	
PARP-1	sc-77470	Santa Cruz Biotechnology	113 kDa	myš	1:1 000	
MDMX	04-1555	Merck Millipore	80 kDa	myš	1:1 000	
MDM2	OP46	Sigma-Aldrich	57–90 kDa	myš	1:500	
γH2AX	613402	BioLegend	15 kDa	myš	1:500	
SR	sc-13509	Santa Cruz Biotechnology	33 kDa	myš	1:1 000	
SRp20	sc-365772	Santa Cruz Biotechnology	23 kDa	myš	1:1 000	
SRp55	sc-57954	Santa Cruz Biotechnology	55–100 kDa	myš	1:1 000	

2.6 IMUNOFLUORESCENCE

Podstatou této metody je detekce proteinů protilátkami značenými fluorescenčním barvivem. V průběhu pozorování ve fluorescenčním mikroskopu fluorofor produkuje fluorescenční signál a tím ukazuje lokalizaci proteinu v buňce.

Nejprve jsem na dno jamek kultivační destičky vložila krycí sklíčka, která byla uchovávána v 70% ethanolu. Poté jsem nasadila na kultivační destičku buněčnou suspenzi o koncentraci 5×10^4 buněk/ml a kultivovala za běžných podmínek po dobu 24 h. Druhý den jsem odsála staré médium a přidala nové s inhibitory o potřebné koncentraci.

2.6.1 FIXACE A PERMEABILIZACE

Po 16 h jsem odsála staré médium a buňky promyla 2×3 min ve studeném PBS. Poté jsem pokryla dno 4% PFA a inkubovala po dobu 10 min, čímž jsem zajistila zafixování buněk. Po ukončení inkubace jsem buňky promyla 2×3 min v PBS, destičku jsem v průběhu promývání odkládala na třepačku. Následně jsem přidala 500 μ l permeabilizačního pufru (0,1% Triton X v PBS) a inkubovala dle potřeby (3 min pro cytoplazmatické proteiny a 10 min pro jaderné proteiny).

2.6.2 BLOKOVÁNÍ

Sklička jsem umístila na misku s parafilmem. Na každé z nich jsem pipetovala 35–50 μ l blokovacího pufru (1% BSA v PBS) a inkubovala 1 h v pokojové teplotě. Poté jsem naředila primární protilátku v blokovacím pufru a inkubovala je při 4 °C přes noc. Následující den jsem je promyla 2×3 min v PBS a pipetovala 40 μ l sekundární protilátky ředěné 1:250 v pufru (1% BSA v PBS + 0,05% Tween 20) na jednotlivá sklička s buňkami. Následující hodinu probíhala inkubace ve tmě při pokojové teplotě. Po skončení inkubace jsem sklička promyla 1×3 min v PBS, naředila DAPI v PBS (1:500) a pipetovala 100 μ l na sklička, která byla inkubována další 3 min, a poté jsem sklička promyla 3×3 min v PBS.

Na podložní sklička jsem připravila kapku VectaShield (Vector Laboratories) o průměru asi 2 mm, krycí skličko jsem promyla v destilované vodě a ponořila ho stranou s buňkami na VectaShield. Toto skličko jsem poté zafixovala k podložnímu sklu pomocí laku, aby nedošlo k vyschnutí buněk. Po zaschnutí jsem preparáty pozorovala pomocí konfokálního mikroskopu Carl Zeiss LSM700 (Jena).

2.7 STANOVENÍ TRANSKRIPČNÍ AKTIVITY PROTEINU P53

Protokol se skládá ze dvou částí, měření aktivity luciferázy a stanovení koncentrace proteinů, jejichž podíl určí výslednou aktivitu p53.

2.7.1 MĚŘENÍ AKTIVITY LUCIFERÁZY

Měření pomocí kitu Luciferase Assay System (Promega) je určeno pro kvantifikaci aktivity genetického reportéru – luciferázy jež je v případě použitých buněk A375 závislá na aktivitě

transkripčního faktoru p53. Ke vzniku světelného signálu dochází při bioluminiscenční reakci, kdy za účasti luciferázy oxiduje luciferin na oxyluciferin.

Na 12jamkovou kultivační destičku jsem nasadila ve sterilním boxu buněčnou suspenzi buněk A375-p53-luc o koncentraci 5×10^4 buněk/ml a kultivovala je za běžných podmínek po dobu 24 h. Následující den jsem odsála staré médium a přidala nové společně s inhibitory. Po uplynutí 16 h jsem si připravila čerstvý lyzační pufr a ze vzorků jsem odsála médium a opatrně promyla $1 \times$ v PBS. Poté jsem přidala 100 μ l lyzačního pufru/1 jamku a inkubovala 15 min na ledu na třepačce. Následně jsem vzorky z kultivační destičky přenesla do mikrozkušavek. Do 96jamkové destičky jsem nanesla 15 μ l lyzátu společně s 25 μ l LAR, a poté změřila na luminiscenci při vlnové délce 570 nm na luminometru TriStar² LB 942 reader (Berthold Technologies Bad Wildbad, Germany).

2.7.2 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Metoda je založena na interakci mezi barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250 a proteiny. Pomocí spektrometrického přístroje je měřena absorbance při vlnové délce 595 nm, která kvantifikuje změnu červené barvy (žádné proteiny) do modré, která vznikne po navázání barviva na proteiny.

Na 96jamkovou destičku jsem v triplicátech nanesla $10 \times$ ředěný vzorek (5 μ l lyzátu, 45 μ l deionizované vody) a 200 μ l reakčního činidla obsahujícího Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad). Po uplynutí 5 min jsem spektrometrem změřila absorbanci při 595 nm, která byla pomocí koncentrační řady standardů BSA přepočtena přístrojem Multimode Detector DTX880 (Beckman Coulter) na koncentraci proteinů.

2.8 TRANSFEKCE siRNA

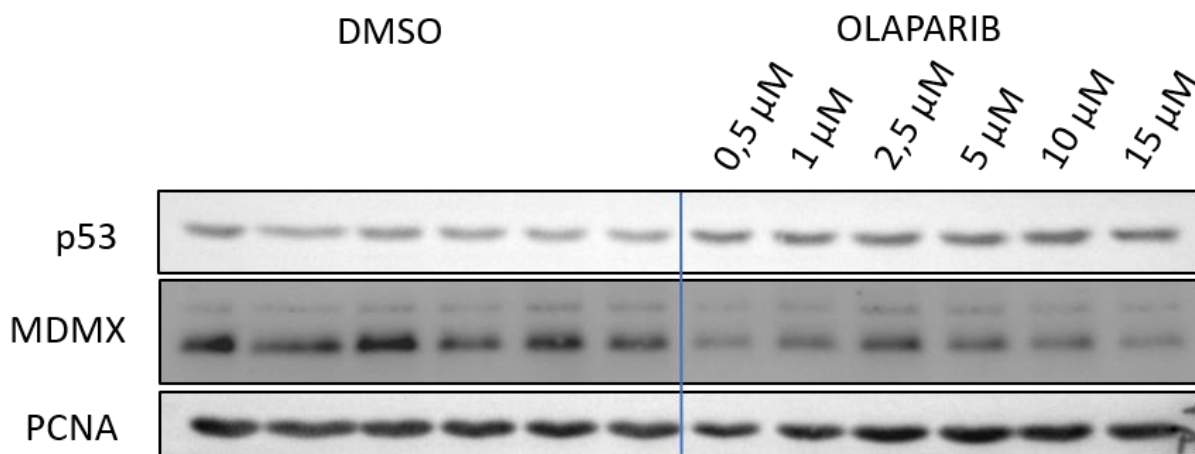
V průběhu procesu tzv. RNA interference se na cílovou mRNA komplementárně naváže krátká RNA – siRNA. Tím je zabráněno translaci mRNA do proteinu, případně může být mRNA i degradována. Exprese genu je posttranskripčně umlčena a cílový protein se nevytvoří.

Nejprve jsem si na 6jamkovou kultivační destičku nasadila ve sterilním boxu buněčné suspenze buněk A375 a MCF7 o koncentraci 5×10^4 buněk/ml a kultivovala za běžných podmínek po dobu 24 h. Druhý den jsem provedla transfekci buněk kontrolní necílicí (NT, non-targeting) siRNA jako negativní kontroly a siRNA cílicí na PARP1. Připravila jsem si 2 zkumavky – do jedné jsem pipetovala 150 μ l média Opti-MEM a 9 μ l transkripčního činidla Lipofectamine

RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific). Do druhé jsem si připravila 150 μ l Opti-MEM a 1,5 μ l NT siRNA nebo 3 μ l PARP1 siRNA. Obsah obou zkumavek jsem smíchala do jedné a nechala inkubovat 5 min. Po inkubaci jsem nanesla směs na příslušné jamky, inkubovala 24 h za běžných podmínek, následující den jsem tento proces opakovala. Následně jsem z těchto vzorků připravila lyzáty na western blot a jeho pomocí detekovala studované proteiny.

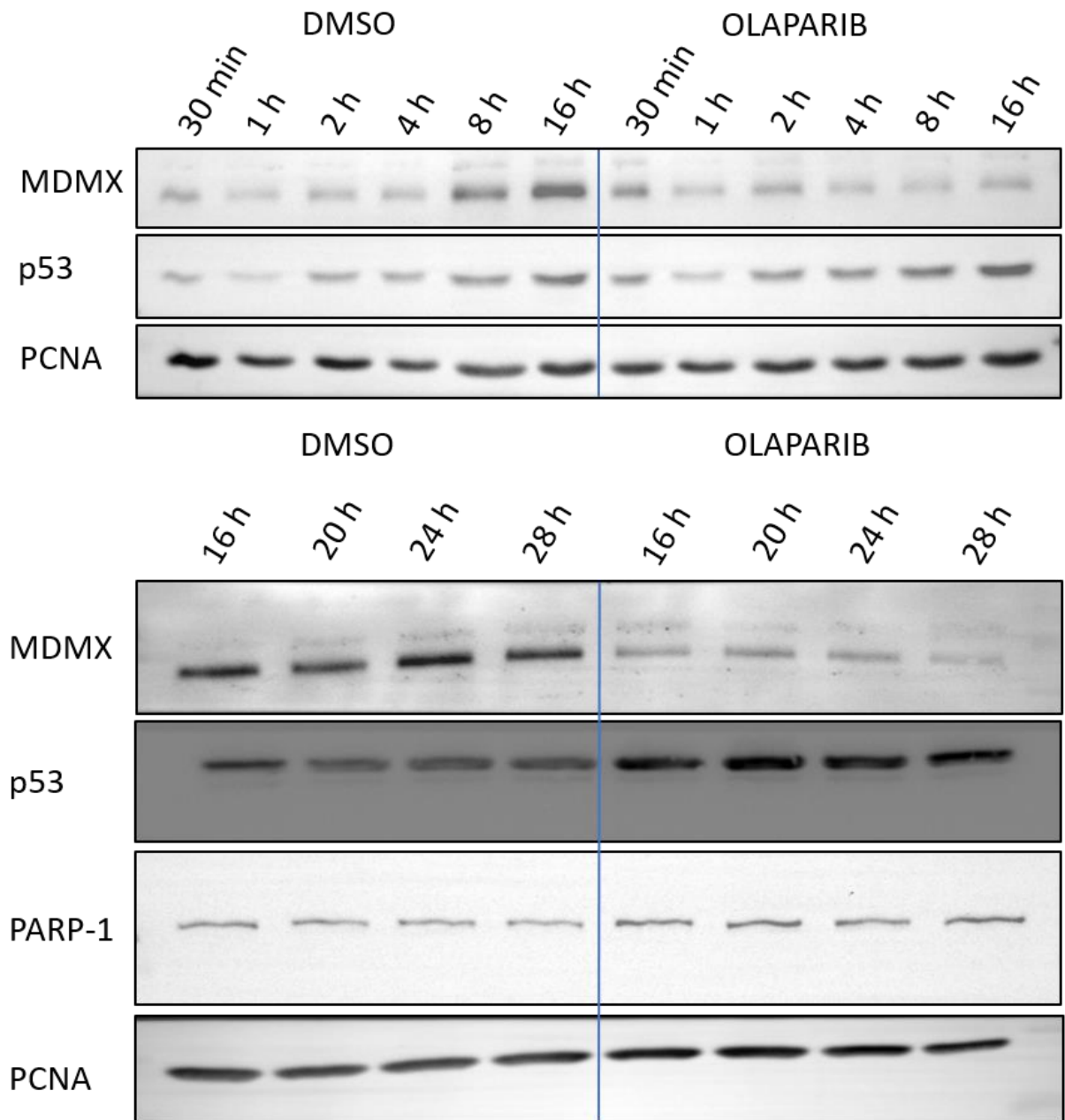
3 VÝSLEDKY

Prvním cílem mé práce bylo otestovat možnost ovlivnění stability a aktivity p53 v buňkách maligního melanomu pomocí inhibitoru PARP. Nejprve jsem pomocí westernového přenosu porovnávala vliv olaparibu v různých koncentracích na hladinu p53 a MDMX v buňkách A375 (viz obrázek 6). Cílem těchto pokusů bylo nalezení optimální koncentrace, kdy se efekt inhibitoru projeví. Buněčnou linii A375 jsem kultivovala společně s olaparibem o koncentracích 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM a 15 μM po dobu 16 h. Poté jsem detekovala proteiny PCNA, MDMX a p53 pomocí monoklonálních protilátek. Ukázalo se, že zvyšující se koncentrace olaparibu nemá vliv na hladinu p53 a u MDMX se také neprojeví výraznější rozdíly. Na základě těchto výsledků jsem v následujících pokusech používala olaparib o koncentraci 10 μM .



Obrázek 6 Působení olaparibu na aktivitu p53 za různé koncentrace [autor].

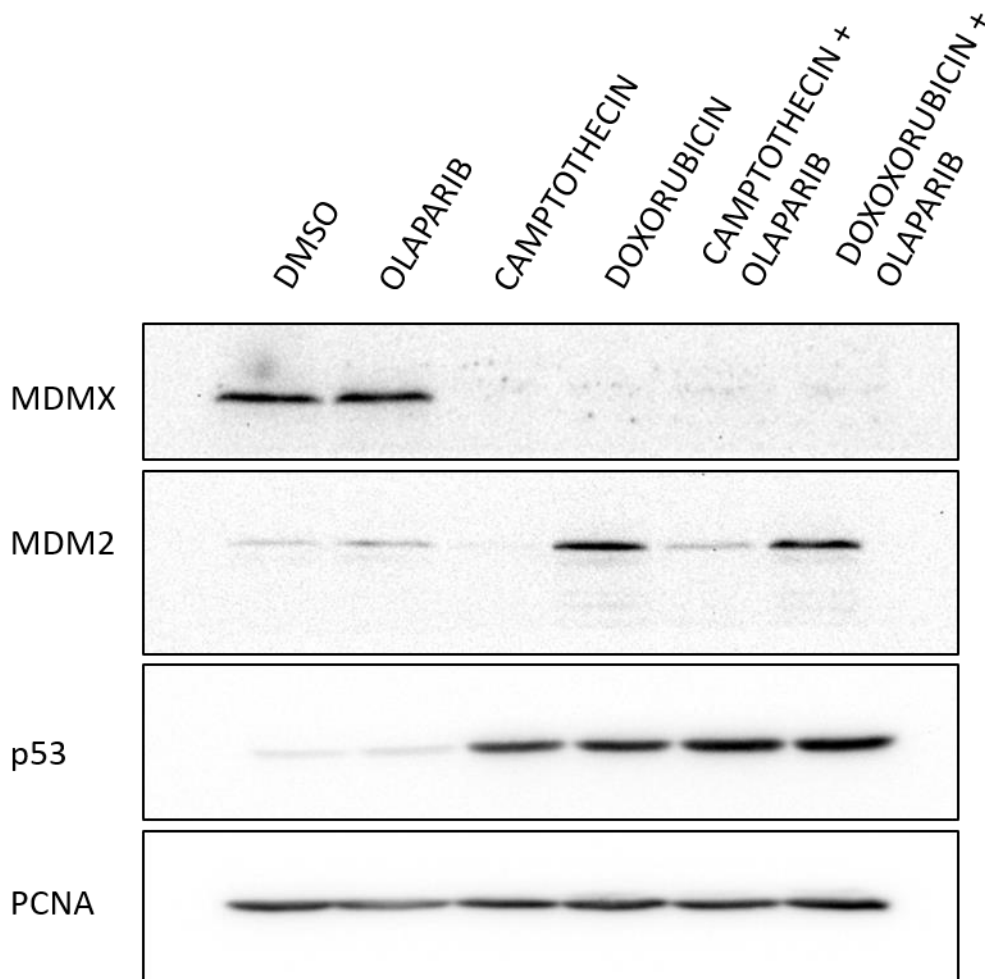
V následujícím pokusu jsem pozorovala změnu hladiny p53 za působení stejného inhibitoru PARP v odlišném čase (viz obrázek 7). Buněčnou linii jsem za přítomnosti inhibitoru PARP o koncentraci 10 μ M kultivovala v různých časech od 30 min do 28 h. Poté jsem detekovala proteiny MDMX, p53, PARP1 a PCNA, sloužící jako kontrola, pomocí monoklonálních protilátek. Ukázalo se, že množství proteinu p53 se postupně zvyšovalo a od 16 h bylo konstantní (viz obrázek 7).



Obrázek 7 Působení olaparibu na aktivitu p53 za různého časového rozlišení [autor].

Dále jsem pozorovala změnu hladiny u proteinů MDMX, MDM2 a p53 v buňkách A375 ovlivněných různými cytostatiky v kombinaci s olaparibem (viz obrázek 8). Buněčnou linii A375 jsem nechala kultivovat po dobu 16 h za působení: olaparibu 10 μ M, camptothecinu 0,5 μ M, doxorubicinu 0,5 μ M a jejich kombinací. K získání výsledků jsem využila westernový přenos a detekovala MDMX, MDM2 a p53. Cytostatika camptothecin a doxorubicin jsem použila jako pozitivní kontroly, neboť byl již dříve popsán vliv poškození DNA na alternativní sestřih mRNA pro MDMX [41].

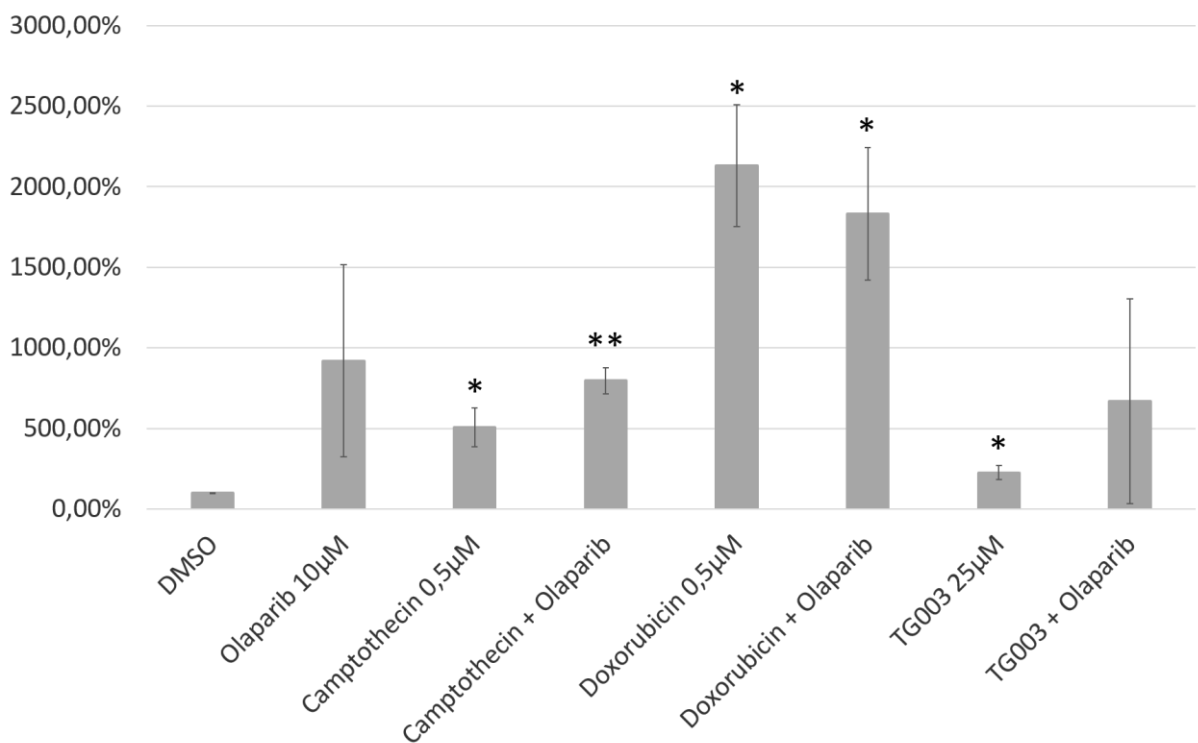
Výsledky ukázaly, že po ovlivnění buněk olaparibem se hladina žádného z detekovaných proteinů výrazně nezměnila. V buňkách ovlivněné camptothecinem, doxorubicinem a jejich kombinacemi se hladina MDMX výrazně snížila a hladina p53 se naopak velmi zvýšila. MDM2 se zvýšila pouze v případě, že byly buňky ovlivněné samotným doxorubicinem či jeho kombinací a k jeho poklesu došlo za působení camptothecinu.



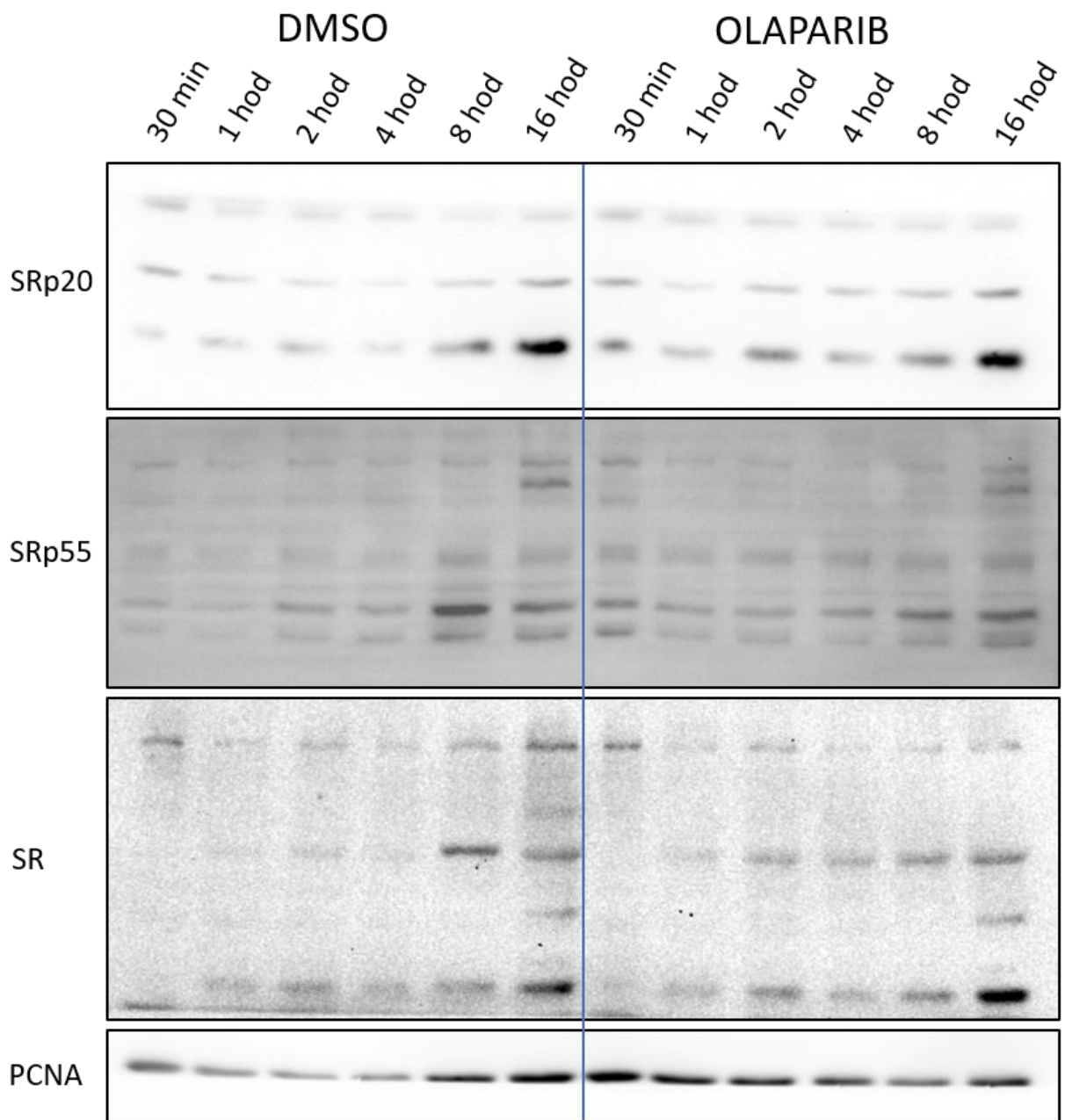
Obrázek 8 Porovnání MDMX, MDM2 a p53 za působení různých inhibitorů [autor].

V následujícím pokusu jsem sledovala transkripční změny aktivity p53 (viz graf 1) pomocí stanovení úrovně transkripce luciferázového reportérového konstruktu. Buněčnou linii A375 jsem ovlivnila inhibitory o koncentraci: olaparib 10 μM , camptothecin 0,5 μM , doxorubicin 0,5 μM , TG003 25 μM a jejich kombinacemi. TG003 je inhibitor kináz rodiny CLK, jež hrají významnou úlohu v regulaci alternativního sestřihu a TG003 dokáže v buňkách ovlivnit i sestřih transkriptu pro MDMX. Ovlivněné buňky jsem inkubovala po dobu 16 h. K nejvyšší aktivitě p53 v buňkách došlo za působení doxorubicinu a následně při kombinaci doxorubicinu s olaparibem. Naopak k nejnižší aktivitě p53 došlo za působení TG003 [42].

Graf 1 *Aktivita proteinu p53 za působení různých inhibitorů*. Směrodatná odchylka je znázorněna v grafu pomocí chybové úsečky a výsledky se vztahují na hodnotu kontroly, která představuje 100 %. Výsledné hodnoty představují průměr tří nezávislých opakování. Symbol * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole (DMSO) na hladině významnosti $P < 0,05$, symbol ** na hladině významnosti $P < 0,01$ [autor].



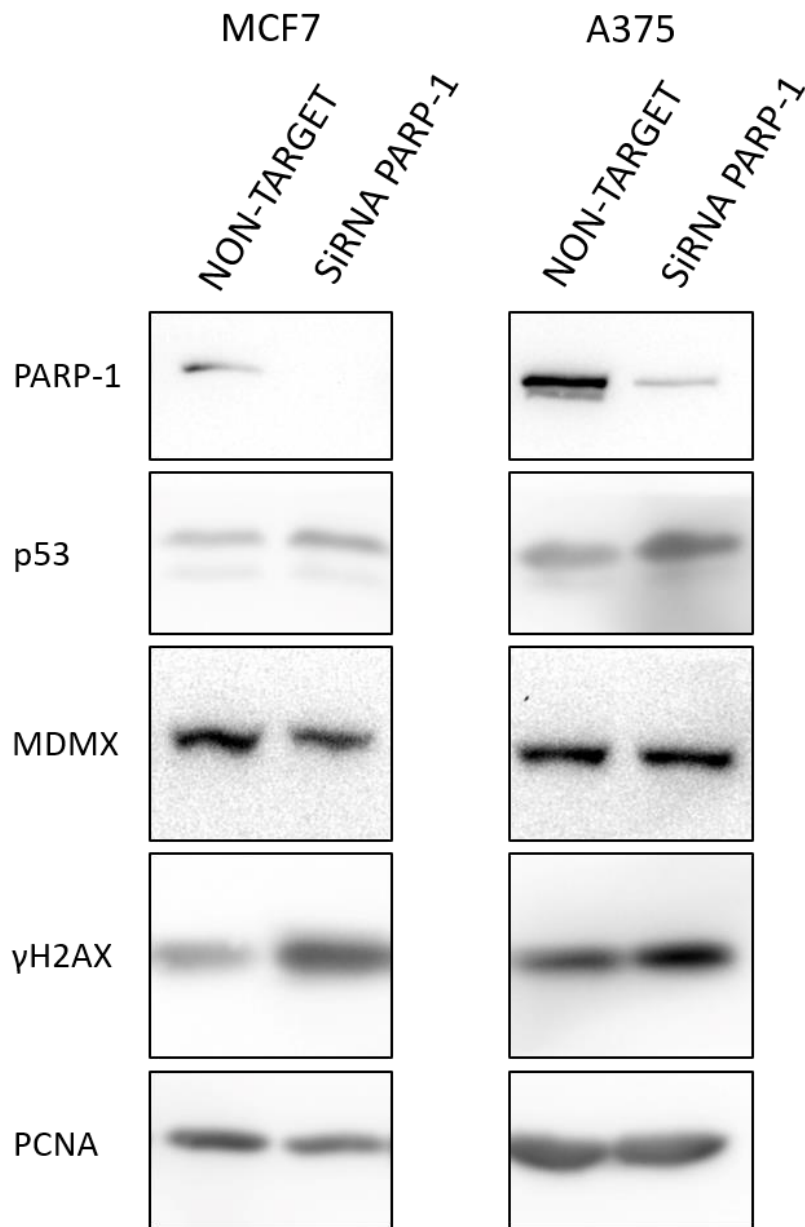
Dalším cílem mé práce bylo analyzovat význam PARP1 pro regulaci alternativního sestřihu mRNA pro MDMX. Buněčnou linii A375 jsem nechala za působení olaparibu inkubovat v časových úsecích od 30 min do 16 h. Následně jsem pomocí westernového přenosu detekovala SR proteiny (viz obrázek 8), jež se podílí na regulaci alternativního sestřihu [37]. Výsledky uvedené v obrázku 9 naznačují, že účinek olaparibu na spektrum SR proteinů se nijak zásadně neliší od účinku samotného rozpouštědla DMSO, jež bylo použito jako negativní kontrola.



Obrázek 9 Vliv olaparibu na SR proteiny [autor].

Jakmile dojde k poškození DNA v buňce, aktivují se opravné mechanismy. Na těchto opravách se podílí např. protein p53 či forma histonu H2AX, která je fosforylovaná na Ser139 (γ H2AX). Pomocí transfekce siRNA jsem v buněčných liniích A375 a MCF7 snížila aktivitu PARP1, aniž bych tento protein poškodila. Následně jsem pomocí westernového přenosu pozorovala změnu hladiny proteinů p53, MDMX a γ H2AX v závislosti na množství hladiny PARP1 (viz obrázek 10). Mimo specifické siRNA pro PARP1 jsem použila také kontrolní siRNA (non-targeting), která by neměla ovlivňovat hladinu proteinu. Výsledek ukázal, že transfekce siRNA fungovala dle očekávání a hladinu PARP1 výrazně snížila v obou liniích. Na rozdíl od MDMX,

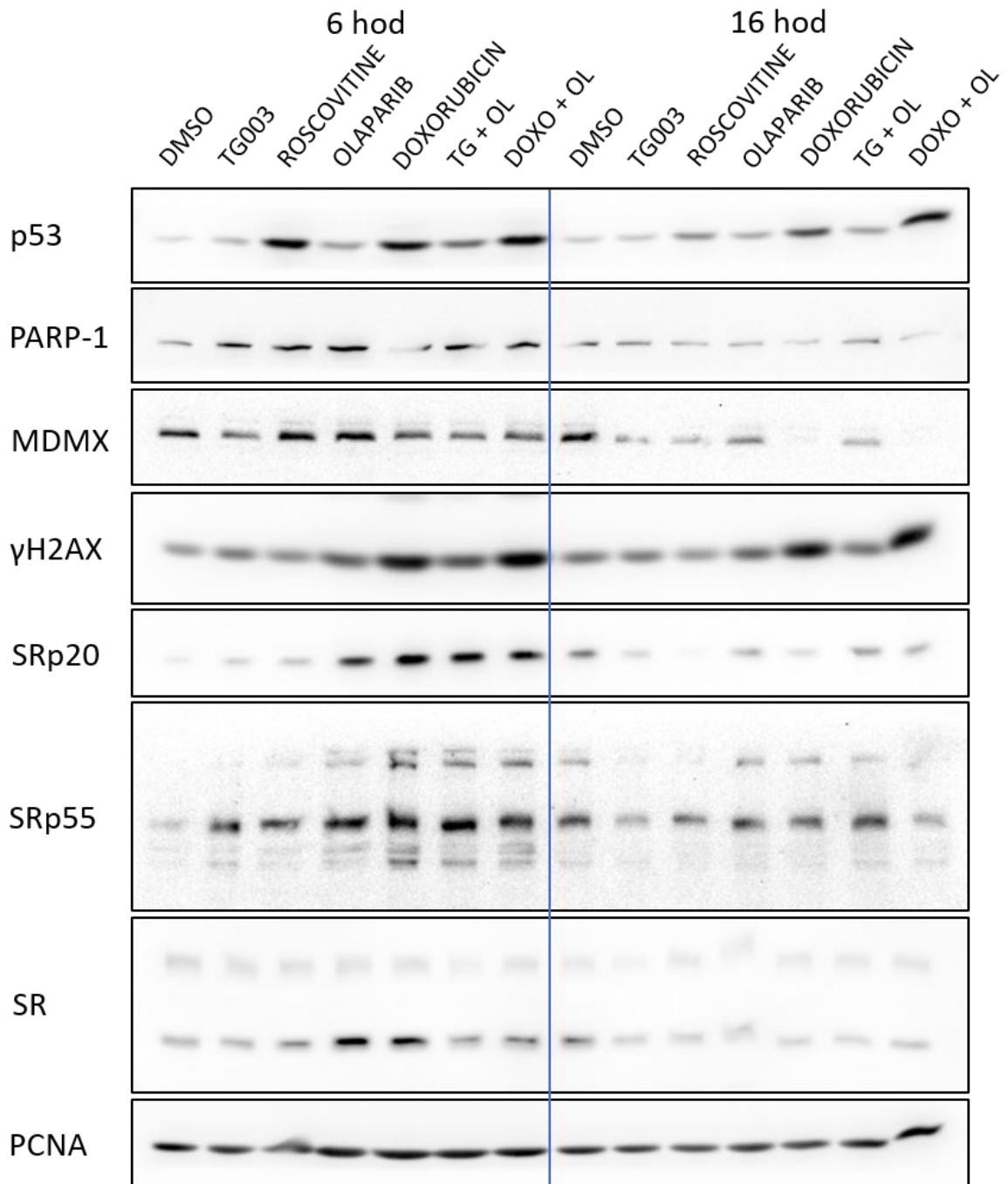
na jehož hladinu neměl pokles hladiny proteinu PARP1 vliv, u fosforylace H2AX, reagující na poškození DNA, se hladina mírně zvýšila. Stejně tak došlo k mírnému navýšení hladiny p53, pravděpodobně související s nárůstem poškození DNA.



Obrázek 10 Změna proteinů p53, MDMX a γ H2AX za snížené PARP1 [autor].

Vzhledem k výsledkům z předchozího pokusu, jsem v následujícím experimentu pomocí westernového přenosu studovala změny sledovaných proteinů po působení inhibitoru PARP (olaparib) společně s různými inhibitory CLK, která se účastní RNA sestřihu, (TG003, roscovitine), cytostatika inhibujícího poškození DNA (doxorubicin) (viz obrázek 11). Buněčnou linii A375 jsem kultivovala po dobu 6 h a 16 h za působení inhibitorů: TG003 25 μ M,

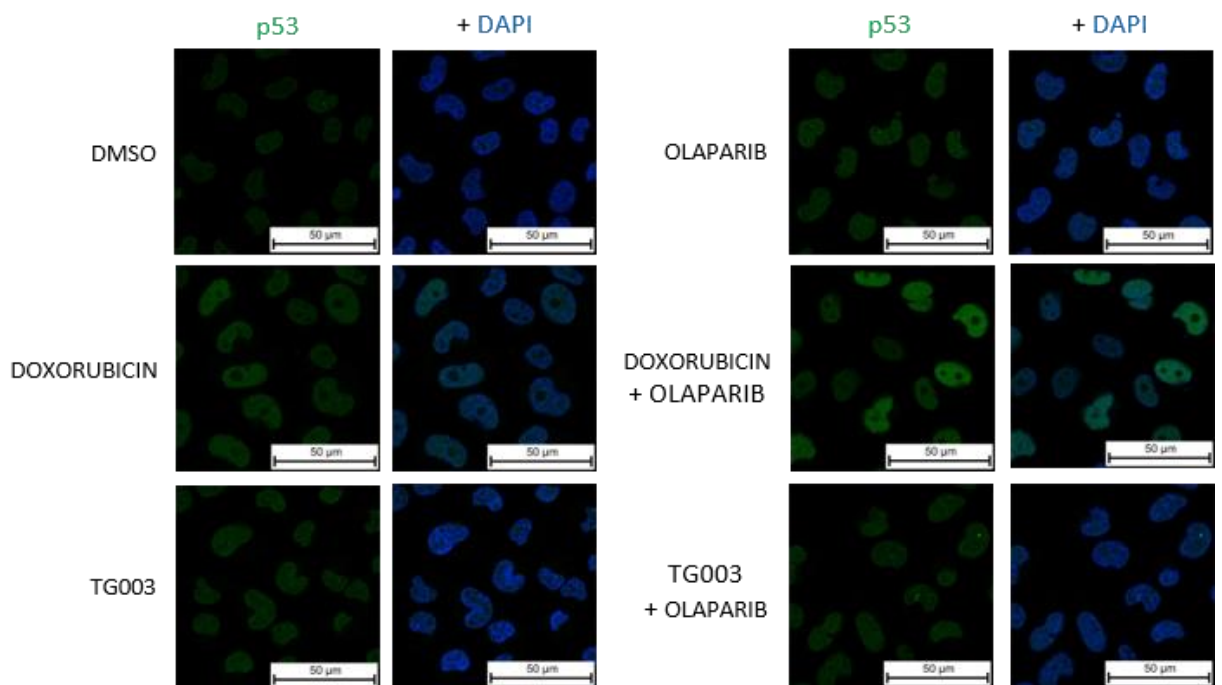
roscovitine 20 μM , olaparib 10 μM , doxorubicin 0,5 μM a jejich kombinací. Hladina většiny proteinů byla po 6h inkubaci vyšší než po inkubaci 16h. Nejvyšší účinek na hladinu p53 mělo působení roscovitinu a doxorubicinu. Nejvyšší vliv na úroveň fosforylace H2AX mělo působení olaparibu a doxorubicinu, také indukovaly přechodné zvýšení některých SR proteinů. V tomto experimentu byl také pozorován vliv delšího působení olaparibu a inhibitorů CLK na hladinu MDMX.



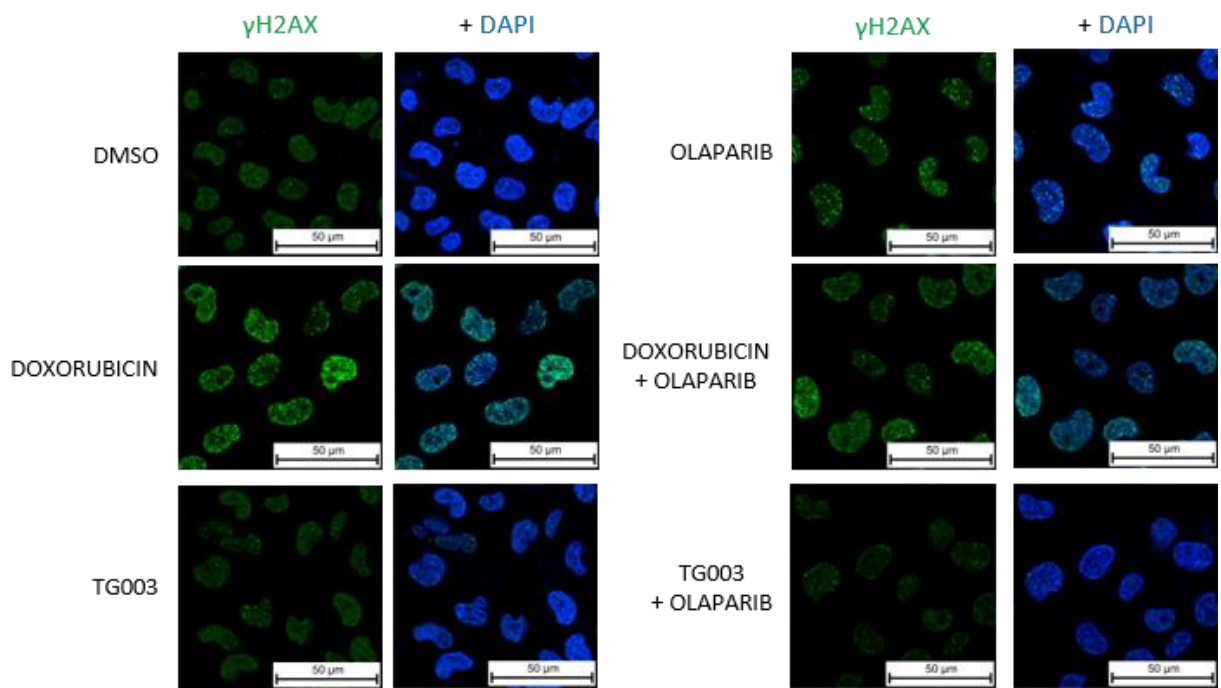
Obrázek 11 *Působení inhibitorů na množství proteinů* [autor]. TG003 je vyjádřen zkratkou TG, olaparib zkratkou OL a doxorubicin je označen DOXO.

Pro další studium proteinů p53, γ H2AX a SR proteinů v buňkách A375, které jsem ovlivnila inhibitory olaparibem 10 μ M, doxorubicinem 0,5 μ M a TG003 25 μ M a jejich kombinacemi po dobu 16 h, jsem použila imunofluorescenci (viz obrázek 12, 13, 14). Měřítka, která jsou uvedena u jednotlivých částí obrázku, znázorňují 50 μ m.

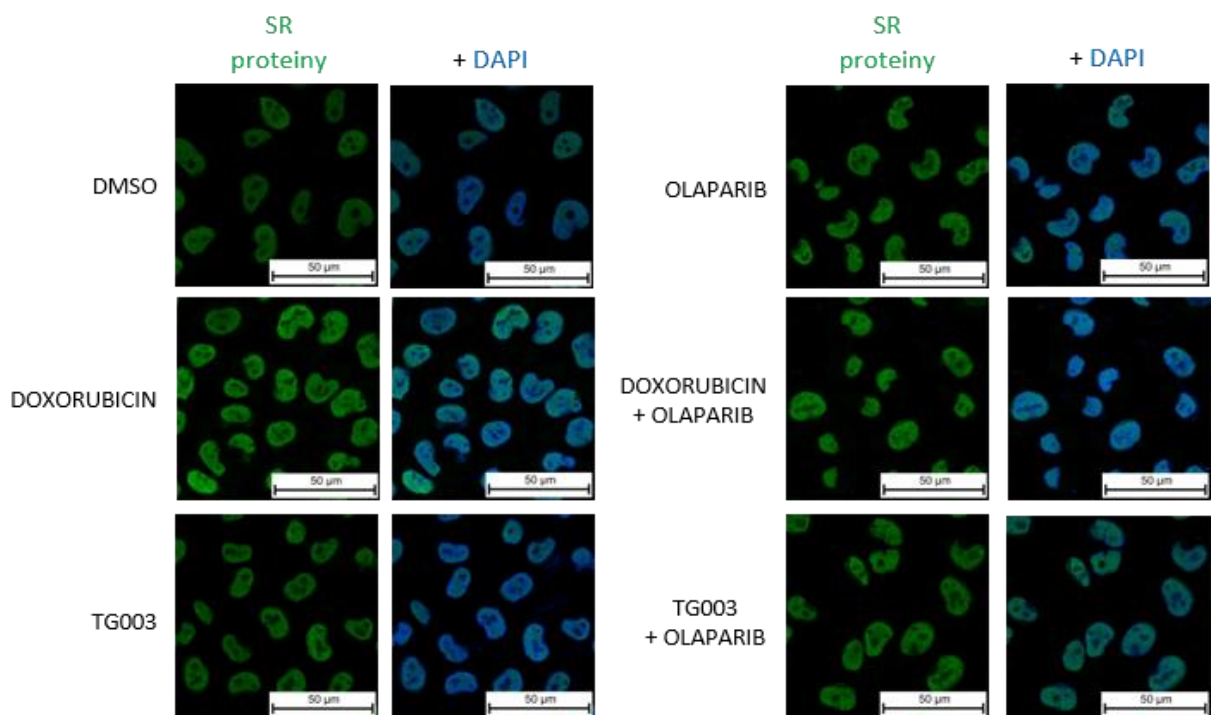
Nejvyšší hladina p53 byla pozorována po ovlivnění buněk kombinací doxorubicinu s olaparibem (viz obrázek 12), u proteinu γ H2AX po ovlivnění buněk doxorubicinem (viz obrázek 13) a u SR proteinů po ovlivnění kombinací TG003 a olaparibu (viz obrázek 14).



Obrázek 12 Ovlivnění hladiny proteinu p53 [autor].



Obrázek 13 Ovlivnění γ H2AX [autor].



Obrázek 14 Ovlivnění SR proteinů [autor].

4 DISKUZE

MDMX byl popsán jako hlavní negativní regulátor p53 v buňkách melanomu. Za jeho zvýšenou expresi v tomto typu nádoru je zodpovědná změna alternativního sestřihu mRNA pro MDMX. Protein PARP1 je důležitým regulátorem oprav poškozené DNA, byla však popsána i jeho možnost zapojení do regulace alternativního sestřihu. Ve svých experimentech jsem proto sledovala možné zapojení PARP1 do regulace hladiny MDMX v buňkách melanomu. Zatímco látky poškozující DNA použité jako pozitivní kontroly v mých experimentech indukovaly výrazné snížení hladiny MDMX a zvýšení hladiny a aktivity p53, účinek inhibitoru PARP olaparibu a inhibice exprese PARP1 pomocí siRNA byl výrazně nižší, a navíc se neprojevil ve všech experimentech [39,40, 42].

5 ZÁVĚR

V práci bylo sledováno možné zapojení proteinu PARP1 do regulace hladiny negativního regulátoru p53 proteinu MDMX v buňkách melanomu. Získané výsledky naznačují, že protein PARP1 nehraje zásadní roli v regulaci aktivity p53 v nádorových buňkách prostřednictvím regulace exprese MDMX. Veškeré stanovené cíle práce byly splněny.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ABRAHÁMOVÁ, J., DUŠEK, L., et al. *Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu*. 1. vydání. Praha : Grada, 2003, 227 s. ISBN 80-247-0499-4
- [2] KRAJSOVÁ, Ivana. *Melanom*. Praha : Maxdorf, 2006, 332 s. ISBN 80-7345-096-8
- [3] SNUSTAD, D. Peter., SIMMONS, J. Michael. *Genetika*. Přel. DOŠKAŘ, Jiří., et al. 2. vydání. Brno : Masarykova univerzita, 2017, 844 s. ISBN 978-80-210-8613-5
- [4] VOKURKA, Samuel., TESAŘOVÁ, Petra., et al. *Onkologie v kostce*. 1. vydání. Praha : Current Media, 2018. 271 s. ISBN 978-80-88129-37-0
- [5] ADAM, Zdeněk., KREJČÍ, Marta., VORLÍČEK, Jiří., et al. *Obecná onkologie*. 1. vydání. Praha : Galén, 2011. 394 s. ISBN 978-80-7262-715-8
- [6] KLENER, Pavel. *Klinická onkologie*. Praha : Galén, 2002. ISBN 80-7262-151-3
- [7] KRAJSOVÁ, Ivana., BAUER, Jan. *Melanom: imunoterapie a cílená léčba*. Praha : Maxdorf, 2017. 381 s. ISBN 978-80-7345-515-6
- [8] ALBERTS, Bruce., et al. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Přel. KOTYK, Arnošt., et al. Ústí nad Labem : Espresso Publishing, 1997. 630 s. ISBN 80-902906-0-4
- [9] *Srovnání se zahraničím. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Cit. 2019-11-16. Dostupné z: <https://www.svod.cz/analysez.php#>
- [10] KRAJSOVÁ, Ivana. *Maligní kožní nádory: průvodce diagnostikou a léčbou nemelanomových kožních nádorů a melanomu*. 1. vydání. Praha : Mladá fronta, 2017, 287 s. ISBN 978-80-204-4186-7
- [11] RESNICK-SILVERMAN, L., MANFREDI, J. J. *Gene-specific mechanisms of p53 transcriptional control and prospect for cancer therapy*. J. Cell. Biochem., 2006. 99(3): 679-689
- [12] LEVINE, A. J., HU, W., FENG, Z. *The p53 pathway: what questions remain to be explored?*. Cell death and differentiation, 2006. 13(6): 1027-1036
- [13] APPELLA, E., ANDERSON, C. W. *Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses*. European journal of biochemistry, 2001. 268(10): 2764-2772
- [14] XU, Y. *Regulation of p53 responses by post-translational modifications*. Cell death and differentiation, 2003. 10(4): 400-403
- [15] IWAKUMA, T., LOZANO, G. *MDM2, an introduction*. Molecular Cancer Research, 2003. 1(14): 993-1000

- [16] HONDA, R., TANAKA, H., YASUDA, H. *Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53*. FEBS letters, 1997. 420(1): 25–27
- [17] DIMITRIADI, M., et al. *P53-independent mechanisms regulate the P2-MDM2 promoter in adult astrocytic tumours*. British Journal of Cancer, 2008. 99(7): 1144-1152
- [18] ITAHANA, K., et al. *Targeted inactivation of MDM2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation*. Cancer Cell, 2007. 12(4): 355-366
- [19] LI, M., BROOKS, C. L., WU-BAER, F., CHEN, D., BAER, R., GU, W. *Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2*. Science, 2003. 302(5652): 1972-1975
- [20] SHI, D., GU, W. *Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity*. Genes Cancer, 2012. 3(3-4): 240-8
- [21] TANIMURA, S., OHTSUKA, S., MITSUI, K., SHIROUZU, K., YOSHIMURA, A., OHTSUBO, M. *MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains*. FEBS letters, 1999. 447(1): 5-9
- [22] DANNOVI, D., MEULMEESTER, E., PASINI, D., MIGLIORINI, D., CAPRA, M., FRENK, R., DE GRAAF, P., FRANCOZ, S., GASPARINI, P., GOBBI, A., HELIN, K., PELICCI, P. G., JOCHEMSEN, A. G., MARINE, J. C. *Amplification of MdmX (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity*. Molecular and cellular biology., 2004. 24(13): 5835-5843
- [23] SHADFAN, M., LOPEZ-PAJARE, V., YUAN, Z. M. *MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53*. Translational cancer research, 2012. 1(2): 88-89
- [24] HERNÁNDEZ-MONGE, J., ROUSSET-ROMAN, A. B., MEDINA-MEDINA, I., OLIVARES-ILLANA, V. *Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB*. Genes Cancer, 2016. 7(9-10): 278-287
- [25] RODRÍGUEZ-VARGAS, J. M., OLIVER-POZO, F. J., DANTZER, F. *PARP1 and Poly(ADP-ribose) Signaling during Autophagy in Response to Nutrient Deprivation*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2019. 2019: 2641712
- [26] RISSEL, D., PEITER, E. *Poly(ADP-Ribose) Polymerases in Plants and Their Human Counterparts: Parallels and Peculiarities*. International journal of molecular sciences. 2019. 20(7): 1638
- [27] HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. 100(1): 57-70

- [28] ZHOU, B. B., ELLEDGE, S. J. *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. 408(6811): 433-9
- [29] SOUTOGLOU, E., MISTELI, T. *Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions*. Science, 2008. 320(5882): 1507-10
- [30] SCHREIBER, V., DANTZER, F., AME, J. C., DE MURCIA, G. *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2006. (7):517-528
- [31] WEI, H., YU, X. *Function of PARylation in DNA Damage Repair Pathways*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. 14(3): 131-139
- [32] BROCHU, G., DUCHAINE, C., et al. *Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase*. Biochimica et biophysica acta, 1994. 1219(2): 342-350
- [33] MERSCH, J., JACKSON, M. A., et al. *Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian*. Cancer, 2015. 121(2):269-275
- [34] RIOS, J., PUHALLA, S. *PARP inhibitors in breast cancer: BRCA and beyond*. Oncology (Williston Park), 2011. 25(11): 1014-1025
- [35] FONG, P. C., BOSS, D. S., YAP, T. A., et al. *Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers*. The New England journal of medicine, 2009. 361(2): 123-134
- [36] DZIADKOWIEC, K. N., GASIOROWSKA, E., NOWAK-MARKWITZ, E., JANKOWSKA, A. *PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting*. Przegląd menopauzalny, 2016. 15(4): 215-219
- [37] KEDZIERSKA, H., PIEKIELKO-WITKOWSKA, A. *Splicing factors of SR and hnRPN families as regulators of apoptosis in cancer*. Cancer letters, 2017. 396: 53-65
- [38] CHEN, M., MANLEY J. L. *Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2009. 10(11): 741-54
- [39] GEMBARSKA, A., LUCIANI, F., et al. *MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma*. Nat. Med., 2012. 18(8):1239-47
- [40] MATVEEVA, E., MAIORANO, J., et al. *Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing*. Cell Discov., 2016. 2:15046
- [41] CHANDLER, D. S., SINGH, R. K., CALDWELL, L. C., BITLER, J. L., LOZANO, G. *Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4*. Cancer Res., 2006. 66(19):9502-8

- [42] DEWAELE, M., TABAGLIO, T., et al. *Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth*. J. Clin. Invest., 2016. 126(1):68-84

7 SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1 CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY NÁDOROVÝCH BUNĚK PODLE DOUGLASE HANAHANA A ROBERTA WEINBERGA.....	14
OBRÁZEK 2 POROVNÁNÍ VÝSKYTU MELANOMU VE SVĚTĚ	20
OBRÁZEK 3 FUNKCE PROTEINU P53.....	21
OBRÁZEK 4 STRUKTURA PROTEINU MDM2	22
OBRÁZEK 5 REGULACE P53 PROTEINEM MDM2.....	22
OBRÁZEK 6 PŮSOBNÍ OLAPARIBU NA AKTIVITU P53 ZA RŮZNÉ KONCENTRACE.....	35
OBRÁZEK 7 PŮSOBNÍ OLAPARIBU NA AKTIVITU P53 ZA RŮZNÉHO ČASOVÉHO ROZLIŠENÍ	36
OBRÁZEK 8 POROVNÁNÍ MDMX, MDM2 A P53 ZA PŮSOBNÍ RŮZNÝCH INHIBITORŮ	37
OBRÁZEK 9 VLIV OLAPARIBU NA SR PROTEINY	39
OBRÁZEK 10 ZMĚNA PROTEINŮ P53, MDMX A γ H2AX ZA SNÍŽENÉ PARP1.....	40
OBRÁZEK 11 PŮSOBNÍ INHIBITORŮ NA MNOŽSTVÍ PROTEINŮ	41
OBRÁZEK 12 OVLIVNĚNÍ HLADINY PROTEINU P53.....	42
OBRÁZEK 13 OVLIVNĚNÍ γ H2AX	43
OBRÁZEK 14 OVLIVNĚNÍ SR PROTEINŮ.	43

8 SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 ABCDE CHARAKTERISTIKA MELANOMU A NĚVŮ	18
TABULKA 2 POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE	26
TABULKA 3 SLOŽENÍ POUŽITÝCH ROZTOKŮ	26
TABULKA 4 TESTOVANÉ LÁTKY	28
TABULKA 5 POUŽITÉ PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY	31

9 SEZNAM GRAFŮ

GRAF 1 AKTIVITA PROTEINU P53 ZA PŮSOBNÍ RŮZNÝCH INHIBITORŮ	38
--	----