



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA TRANKRIPČNÍCH VARIANT GENU TP 53 V LIDSKÝCH LEUKEMICKÝCH BUŇKÁCH

ANALYSIS OF TP53 GENE TRANSCRIPTIONAL VARIANTS IN HUMAN LEUCEMIC CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VERONIKA VLAHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Jitka Malčíková, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0757/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Veronika Vlahová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Jitka Malčíková, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Analýza transkripčních variant genu TP 53 v lidských leukemických buňkách

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Zpracujte získané experimentální výsledky
4. Vyhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Veronika Vlahová
Student(ka)

RNDr. Jitka Malčíková, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce shrnuje obecné informace o lidském genu *TP53* a proteinu p53, který je tímto genem kódován. Je zde pojednáno také o transkripčních variantách – izoformách p53.

Experimentální část je zaměřena na detekci izoformy p53 β a její kratší, dosud nepopsanou formu. Výchozím materiálem je periferní krev pacientů Fakultní nemocnice Brno, ze které byla po zpracování izolována RNA. Ta byla dále přepsána reverzní transkripcí do cDNA, která byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Experimentálním měřením bylo dokázáno, že p53 β se vyskytuje ve všech B-lymfocytech pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Byla také prokázána existence kratší formy p53 β .

ABSTRACT

The theoretical part of the thesis summarizes general information about the human *TP53* gene and p53 protein, which is encoded by this gene. There is also dealt with the transcriptional variants - p53 isoforms.

The experimental part is focused on the detection of isoform p53 β and its shorter, yet undescribed form. The starting material is peripheral blood of patients from University Hospital Brno, from which RNA was isolated. Subsequently, RNA was transcribed by reverse transcription into cDNA which was amplified by polymerase chain reaction (PCR).

Experimental measurements demonstrate that p53 β occurs in all the B-lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia. It also demonstrates the existence of a shorter form of p53 β .

KLÍČOVÁ SLOVA

p53, chronická lymfocytární leukémie, mutace, izoformy

KEYWORDS

p53, chronic lymphocytic leukemia, mutation, isoforms

VLAHOVÁ, V. *Analýza transkripčních variant genu TP53 v lidských leukemických buňkách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012, 68 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jitka Malčíková, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Děkuji především své vedoucí RNDr. Jitce Malčíkové Ph.D. za toto atraktivní téma, za cenné rady a připomínky k diplomové práci a také za podporu a milý přístup po celou dobu analýz. Děkuji také Lence Juračkové za seznámení s laboratorními zásadami na pracovišti a za trpělivost, Mgr. Barboře Kantorové za seznámení s metodou PCR a pravidly PCR laboratoře a RNDr. Jitce Kabáthové, Bc. a Mgr. Lucii Poppové za jejich milý přístup a ochotu kdykoliv mi pomoci. Děkuji také své konzultantce Mgr. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za poznámky k formě diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Centra molekulární biologie a genové terapie při Fakultní nemocnici Brno, kde byla tato práce zpracována.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Tumor supresorový gen <i>TP53</i> a protein p53	8
2.1.1 Historie.....	9
2.1.2 Struktura proteinu	9
2.1.2.1 N-koncová doména	9
2.1.2.2 Centrální doména	10
2.1.2.3 C-koncová doména	10
2.1.3 Regulace p53	11
2.1.3.1 Regulace v normálních buňkách	11
2.1.3.2 Regulace p53 v buňkách poškozených stresovými faktory	12
2.1.4 Funkce p53	12
2.1.4.1 Zástava buněčného cyklu	13
2.1.4.2 Indukce apoptózy	14
2.1.4.3 Angiogeneze	15
2.1.4.4 p53 a metabolismus	15
2.1.5 Genová rodina p53	17
2.1.5.1 Struktura a funkce p63 a p73	17
2.1.5.2 Mutace a rakovina	18
2.1.6 Izoformy p53	18
2.1.6.1 TAp53 izoformy	19
2.1.6.2 $\Delta 40$ p53 izoformy	20
2.1.6.3 $\Delta 133$ p53 izoformy	20
2.1.6.4 $\Delta 160$ p53 izoformy	21
2.1.6.5 Role p53 izoform při vzniku rakoviny	21
2.1.7 Mutace a delecce v genu <i>TP53</i>	21
2.1.7.1 Inaktivace proteinu p53	21
2.1.7.2 Četnost, výskyt a typy mutací proteinu p53	22
2.1.7.3 Somatické mutace p53	23
2.1.7.4 Záradečné mutace p53	24
2.2 Chronická lymfocytární leukémie	25
2.2.1 Prognostické faktory CLL	26
2.2.2 Léčba pacientů s CLL	27
2.2.3 Vyšetření p53 u CLL	28
3 CÍLE PRÁCE	30
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 Materiál a soubor pacientů	31
4.1.1 B-lymfocyty CLL pacientů	31
4.1.2 B-lymfocyty transformované EB virem	31
4.1.3 RNA buněčných linií	31
4.1.4 Plazmidy	31
4.2 Použité přístroje	31
4.3 Metody	32
4.3.1 Zpracování krve	32

4.3.2 Izolace totální RNA	32
4.3.3 Reverzní transkripce SuperScript II	33
4.3.4 Polymerázová řetězová reakce PCR	34
4.3.5 Agarózová gelová elektroforéza	36
4.3.6 Restrikční štěpení	36
4.3.7 DNA čip – Bioanalyzer	37
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
5.1 Optimalizace PCR pro amplifikaci p53β	38
5.2 Zjištění minimálního výchozího množství DNA detekovatelného po PCR na 1,5% agarózovém gelu	40
5.3 Screening p53β	43
5.3.1 Screening p53β CLL pacientů v B-lymfocytech	43
5.3.2 Screening p53β CLL pacientů v buněčných liniích	46
5.4 Restrikční štěpení vybraných PCR produktů – detekce p53βΔ16	47
5.5 Analýza pomocí Bioanalyzeru	49
6 ZÁVĚR	52
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	53
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	67

1 ÚVOD

Gen *TP53* patří mezi významné tumor supresorové geny. Kóduje protein p53, což je transkripční faktor odpovědný za správnou odpověď buňky na stresové podmínky.

Protein p53 je jaderný fosfoprotein, který dohlíží na správný průběh buněčného dělení. V současnosti je známo 100-150 (podle různých zdrojů) přímých cílových genů, na které p53 působí.

Při poškození DNA vyvolá protein p53 zástavu buněčného cyklu. Tím získá buňka čas na opravu poškozené DNA. Protein p53 aktivuje další geny, aby mohly opravit poškození. Pokud dojde k vážnějšímu narušení buněčné DNA, spustí p53 expresi jiné skupiny genů, které navozují apoptózu. Tímto způsobem p53 předchází dělení buněk s poškozenou DNA, jejichž dělení by vedlo k nádorové transformaci. Je tedy zajištěn vznik pouze zdravých buněk. Z toho vyplývá, že poškození p53 má velmi vážné následky. Díky svým ochranným funkcím bývá p53 velmi často označován jako „strážce genomu“.

Je zřejmé, že stabilita a aktivita p53 musí tedy být velmi důkladně regulována. Hlavní regulační úlohu plní protein MDM2 (MDM - mouse double minute), který inhibuje transkripční aktivitu p53, nebo indukuje jeho degradaci.

Vážným problémem jsou mutace v genu *TP53*, které vedou k inaktivaci p53. Mutace p53 je nejčastější mutací vyskytující se v rakovinných buňkách. Dysfunkce proteinu p53 je také spojována s agresivnějším průběhem onemocnění a horší prognózou. Extrémním případem je Li-Fraumeniho syndrom, kdy genetický defekt v p53 vede k vysoké četnosti rakoviny u postižených jedinců, a to dokonce už v raném věku. Většina mutací, které deaktivují p53, způsobují ztrátu schopnosti proteinu vázat se k jeho cílovým DNA sekvencím, a zabrání tak transkripční aktivaci příslušných genů. Někdy může být problém i v drahách, jejichž spuštění p53 vyvolává.

Díky alternativnímu sestřihu může vznikat 12 různých izoform p53, z nichž každá má trochu odlišnou strukturu a funkci. Tyto izoformy mají také souvislost se vznikem nádorů.

Současný výzkum se zaměřuje na porozumění všech drah souvisejících s proteinem p53, na stanovení a zkoumání izoform p53 a na obnovu původních funkcí mutovaných forem p53.

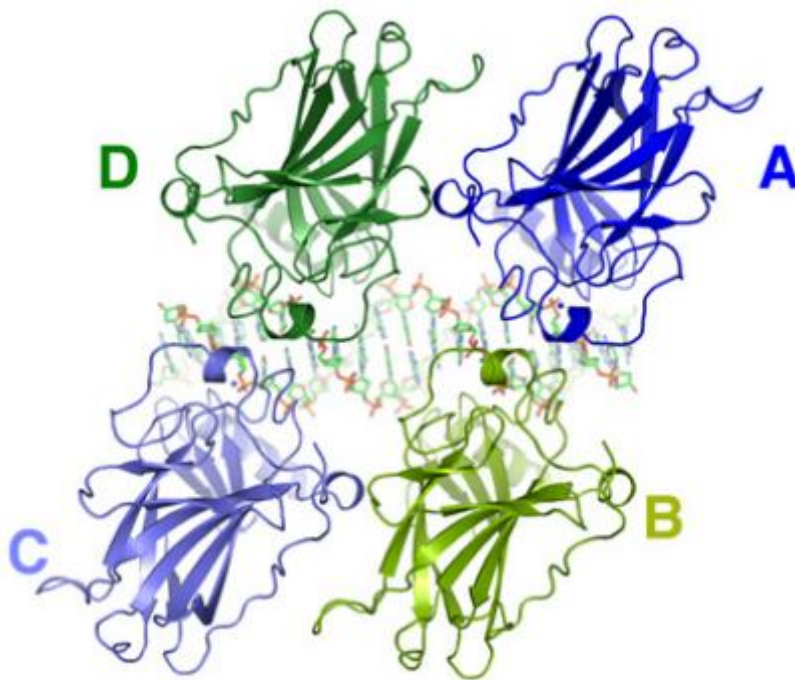
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Tumor supresorový gen *TP53* a protein p53

Gen *TP53* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17, konkrétně se jedná o lokus 17p13.1, a je dlouhý 20 kilobází (kb). Obsahuje 11 exonů a 10 intronů, které celkově kódují 393 aminokyselin [1].

Gen *TP53* patří do rodiny genů p53 spolu s dalšími dvěma analogy – geny pro proteiny p63 a p73. Tyto tři proteiny mají podobnou sekvenci i strukturu. Proteiny p63 a p73 rozpoznávají také stejná DNA-vazebná místa jako p53 a pokud jsou v organismu exprimovány, mohou aktivovat geny, které navozují apoptózu. Každý z těchto proteinů plní důležitou funkci v buněčném cyklu i při vzniku nádoru a může se vyskytovat v několika izoformách.

Protein p53 je evolučně velmi starý, vyskytuje se u všech významných skupin obratlovců [2]. Tumor-supresorový protein p53 je lokalizován v jádru buněk po celém těle, kde se váže přímo na DNA. Většina buněčných procesů řízených p53 závisí na jeho schopnosti aktivovat transkripci cílových genů. Pro účinnou aktivaci transkripce je nutné, aby vznikl tetramer p53 (Obrázek 1), který se v promotorech cílových genů váže na dvě sekvence 5'PuPuPuCA/T T/A GPyPyPy-3' (Pu = purinová báze a Py = pyrimidinová báze), které mohou být odděleny až 13 páry bazí [3 s. 53].



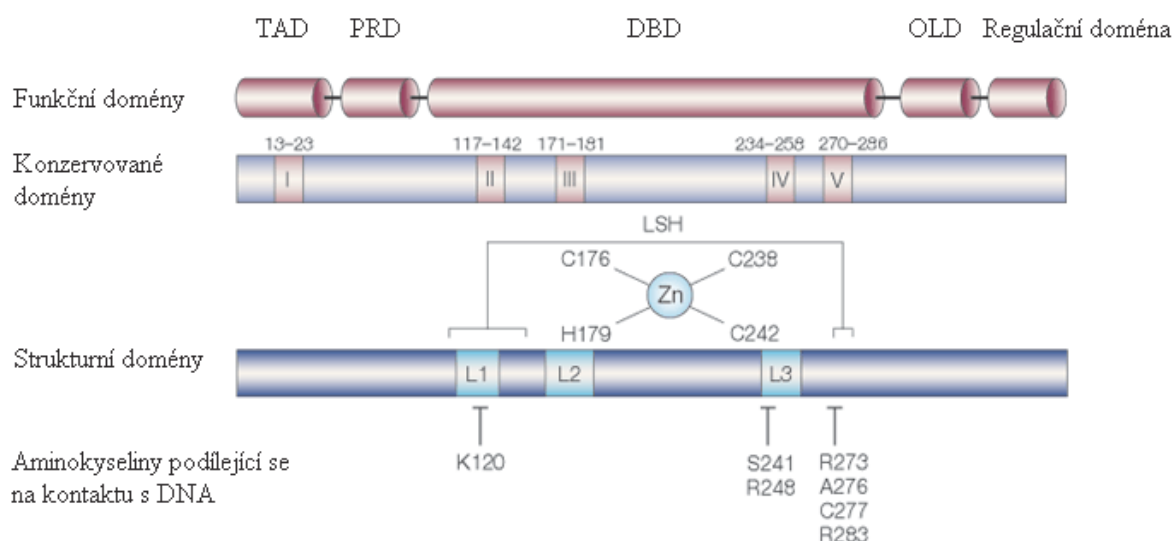
Obrázek 1: Tetramerní forma p53 navázaná na DNA: jednotlivé monomery jsou odlišeny barevně a označeny písmeny A, B, C a D [4]

2.1.1 Historie

Protein p53 byl objeven roku 1979. Z počátku se zdálo, že jde o onkogen kvůli jeho vysoké expresi v nádorových tkáních, ale později bylo zjištěno, že jde o nádorový supresor. V původních studiích byla totiž pro výzkum použita cDNA (complementary DNA) s mutovanou formou p53 [5].

2.1.2 Struktura proteinu

Monomerní protein p53 se skládá ze tří domén: N-koncová doména, centrální doména a C-koncová doména (Obrázek 2). Na C- a N- koncích probíhají posttranslační úpravy proteinu, jako jsou acetylace a fosforylace [6].



Obrázek 2: Znázornění domén proteinu p53: V DBD se nacházejí strukturní motivy L1 (L – Loop, smyčka), L2, L3 a LSH (Loop-Sheet-Helix, smyčka-list-helix), upraveno [7]

2.1.2.1 N-koncová doména

N-koncová doména obsahuje dvě domény. Těmi jsou transaktivační doména (TAD – Transactivation Domain, aminokyseliny 1-43) a doména bohatá na proliny (PRD – Proline Rich Domain, aminokyseliny 61-94) [8].

TAD obsahuje místo pro vazbu proteinu MDM2 [9] a je důležitá pro správnou regulaci aktivity proteinu p53 [10].

PRD se účastní indukce apoptózy [11] a je také velmi důležitá pro transaktivaci cílových genů proteinu p53 [12]. Na tuto doménu se také váže protein iASPP (inhibitory Apoptosis Stimulating Protein of p53), který má inhibiční vliv na apoptózu [13].

2.1.2.2 Centrální doména

Centrální doména, nebo také DNA-vazebná doména (DBD – DNA Binding Domain, aminokyseliny 110-286) [8], se účastní sekvenčně-specifické vazby na promotory genů regulujících p53 [14]. Právě tato doména se váže na konsensus sekvenci 5'PuPuPuCA/T T/A GPyPyPy-3'.

Ze všech popsanych mutací proteinu p53 se 71 % z nich nachází právě zde [8], [15]. Bodové mutace v této doméně jsou nejfrekventovanějšími změnami v p53, které se vyskytují v nádorových buňkách [16], [17], protože potlačují jeho aktivitu jako nádorového supresoru [8]. V důsledku toho dochází ke zhoršení nebo až ke znemožnění vazby proteinu p53 na DNA a tím k narušení jeho transkripční funkce.

2.1.2.3 C-koncová doména

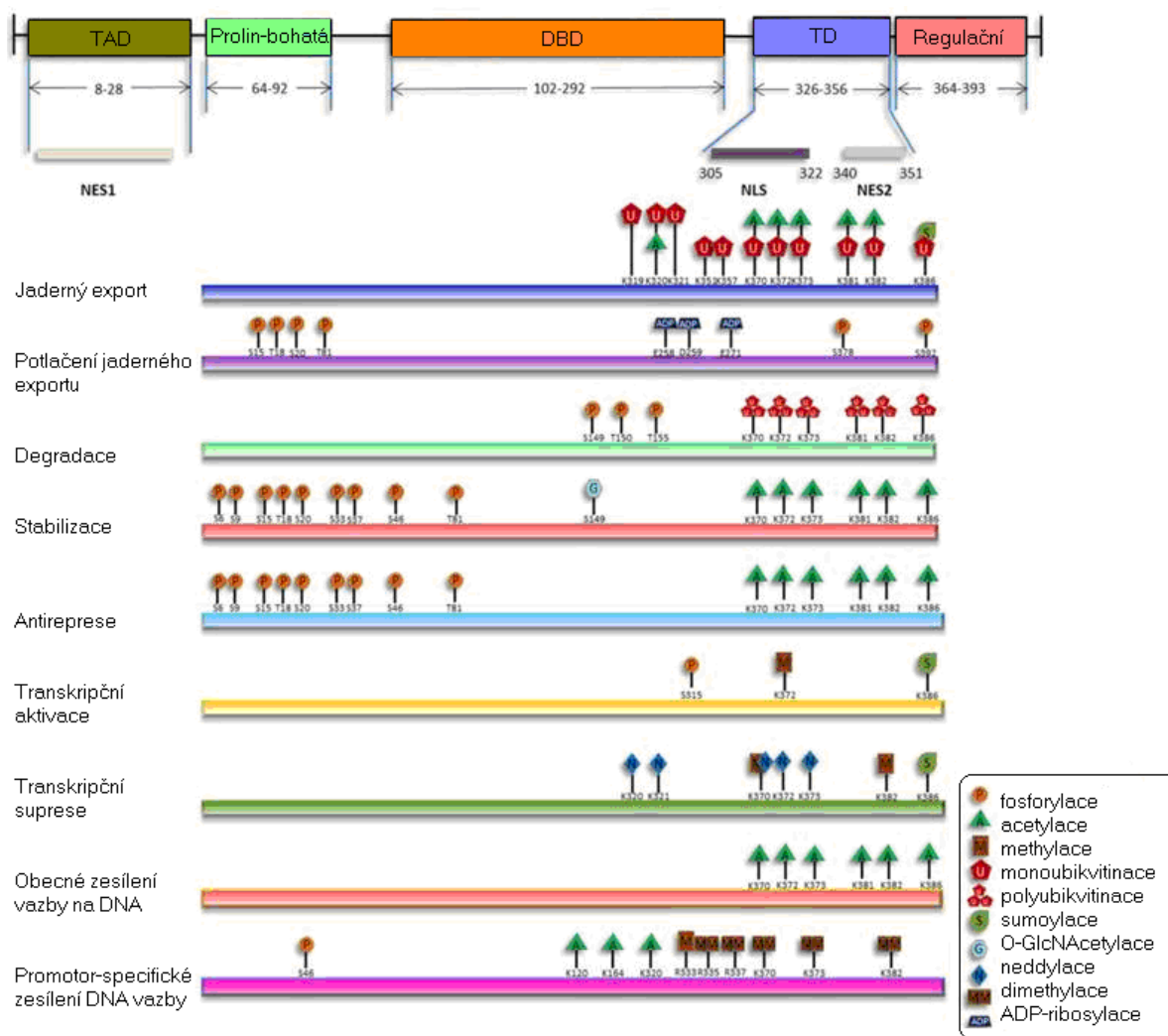
C-koncová doména obsahuje tetramerizační doménu (4D, OD, OLD – Tetramerization Domain, aminokyseliny 326-355) a regulační doménu (aminokyseliny 363-393) [8]. C-koncová doména (CTD – C-Terminal Domain) pravděpodobně hraje hlavní roli při opravách a rekombinaci DNA [16] a reguluje interakce DBD proteinu p53 s molekulou DNA [18].

Tetramerizační doména, neboli oligomerizační doména, umožňuje oligomerizaci tohoto proteinu, tedy uspořádání čtyř molekul p53 do tetrameru, a je nezbytná pro protein-proteinové interakce, posttranslační modifikace, degradaci p53 a pro navázání DNA [8]. Je také důležitá při přechodu proteinu p53 z jádra do cytoplasmy pomocí jaderného exportního signálu NES (Nuclear Export Signal) [18]. Mutace v tetramerizační doméně vedou k nesprávnému utvoření tetrametu. Místo správně poskládaného tetrametu pak mohou vznikat tertramery s pozměněnou strukturou, dimery, nebo protein zůstane ve formě monomeru [19, 20]. V takových případech může dojít ke změně jeho vazebných schopností a vazba se nemusí vůbec uskutečnit [21].

2.1.3 Regulace p53

Vzhledem k zásadním funkcím p53 v organismu je potřeba jeho důkladné regulace. Klíčovou roli v regulaci stability p53 hraje MDM2, jehož exprese je vyvolána samotným p53 proteinem. Celá regulace je vlastně zpětnovazebná autoregulační smyčka: protein p53 vyvolává expresi MDM2 a ten se zase podílí na jeho degradaci [22].

Hlavní regulační mechanismy probíhají na posttranslační úrovni (Obrázek 3), ale některé mechanismy byly objeveny také na úrovni transkripce (indukce interferonem alfa/beta [23]) a translace (zvýšení translace vyvolá např. působení UVC záření [24] nebo gamma záření [25]). Posttranslační modifikace mohou probíhat nejméně na 18 místech [26].



Obrázek 3: Posttranslační modifikace proteinu p53, upraveno [27]

2.1.3.1 Regulace v normálních buňkách

V normálních buňkách se protein p53 nachází v malých koncentracích díky jeho rychlé degradaci v proteasomem 26S [28]. Proteasom umí rozeznat pouze proteiny, které jsou označené ubikvitinem. Ubikvitin se kovalentně váže k lyzinům cílových proteinů. Nejprve je v buňce navázán a tím aktivován pomocí ubikvitin-aktivujícího enzymu E1. Potom je přenesen na enzym E2 (ubikvitin-přenašeč) a pomocí ubikvitin-ligázy E3 je ubikvitin navázán na protein určený k degradaci. Právě aktivitu ubikvitin-ligázy má už zmiňovaný protein MDM2 [29]. Navázáním MDM2 na p53 dojde k částečnému překrytí transkripční domény p53 a tím i ke znemožnění navázání p53 na DNA a indukci transkripce cílových genů [30]. Komplex p53-MDM2 je poté transportován z jádra do cytoplasmy, kde degradace probíhá [29]. Pokud by byl některý mezičlánek degradace p53 v normální buňce defektní, došlo by k nahromadění p53 a zvýšení jeho koncentrace, což by mohlo indukovat nežádoucí apoptotický proces.

Byly objeveny jaderné exportní signály NES pro p53 (pro p63 a p73 dosud žádné jaderné exportní signály identifikovány nebyly). Z toho lze vyvodit, že MDM2 a p53 mohou unikat z jádra nezávisle na sobě [22 s. 63].

Strukturně je proteinu MDM2 velmi podobný protein MDMX, neboli MDM4. Vysokého stupně homologie je dosaženo především v N-terminální doméně, která je zodpovědná za vazbu na protein p53 [31]. Proto se MDM4 může také navázat na p53 a blokovat tak jeho transkripční aktivitu [32]. Není ale schopný ubikvitinace a degradace p53. Na druhou stranu ale není závislý na transkripční aktivitě p53 [31].

2.1.3.2 Regulace p53 v buňkách poškozených stresovými faktory

V případě, že buňka byla vystavena působení faktorů, které poškozují její DNA, dochází ke zvýšení koncentrace p53. Stresové signály iniciují posttranslační modifikace p53 (fosforylace, acetylace, metylace, ubikvitinace nebo sumylace), které vedou k jeho aktivaci. Potom může p53 aktivovat transkripci cílových genů potřebných k následné odpovědi na stres.

Posttranslační modifikace zvyšují poločas rozpadu p53 z 20 minut až na několik hodin. Tím dojde k několikanásobnému zvýšení jeho koncentrace v buňce. Dále tyto modifikace umožňují vazbu p53 na DNA a tím regulaci transkripce cílových genů [33]. Cílové geny p53 potom navodí potřebnou odpověď na aktuální stav buňky.

U mnoha typů poškození DNA, které stabilizují p53, bylo zjištěno, že indukují fosforylaci p53 ve specifických místech. Obzvláště zajímavé z tohoto hlediska jsou v lidském p53 aminokyseliny Ser15, Ser20, Ser37 a Thr18, jejichž fosforylace redukuje asociaci s MDM2 a následkem toho chrání p53 před degradací [22]. Důležité posttranslační modifikace u buněk poškozených genotoxickým stresem probíhají také na Ser 392. Fosforylace na tomto místě zvyšuje asociační konstantu pro tetramerní formu tohoto proteinu a může zvyšovat vazbu specifických sekvencí DNA. Fosforylace na Ser 15 představuje časnou odpověď buňky na genotoxický stres [26]. Fosforylaci zprostředkovávají kinázy ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (Ataxia Teleangiectasia and Rad3 related), JNK (Jun Kináza) a další. Fosforylovány ale mohou být i další aminokyseliny. Proteiny MDM2 a JNK působí nezávisle na sobě [34].

Na rozdíl od degradace proteinu p53 v nepoškozených buňkách se komplexy MDM2-p53 vyskytují specificky v S a G2/M fázi [35].

2.1.4 Funkce p53

p53 je multifunkční protein, který je odpovědný za správnou odpověď buňky na stresové podmínky, jako je ionizující záření, UV záření, infračervené záření, hypoxie, působení toxických látek a další stresové faktory. Jeho účinky jsou zprostředkovány vazbou proteinu jako tetrametru na DNA. Protein p53 hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, reparaci DNA poškozené různými stresovými faktory a v navození apoptózy v případě, že je poškození DNA příliš rozsáhlé a neopravitelné. To, zda bude buněčná DNA opravena, nebo bude indukována apoptóza, sděluje p53 několika způsoby. Jedním z nich je koncentrace proteinu v buňce. Nižší množství vyvolá zástavu buněčného cyklu a vyšší hladina proteinu

vede k indukci buněčné smrti [36]. Podílí se také na senescenci, opravách DNA, změně metabolismu [37], replikaci, transkripci, diferenciaci, udržování stability genomu a mnoha dalších dějích [38–40].

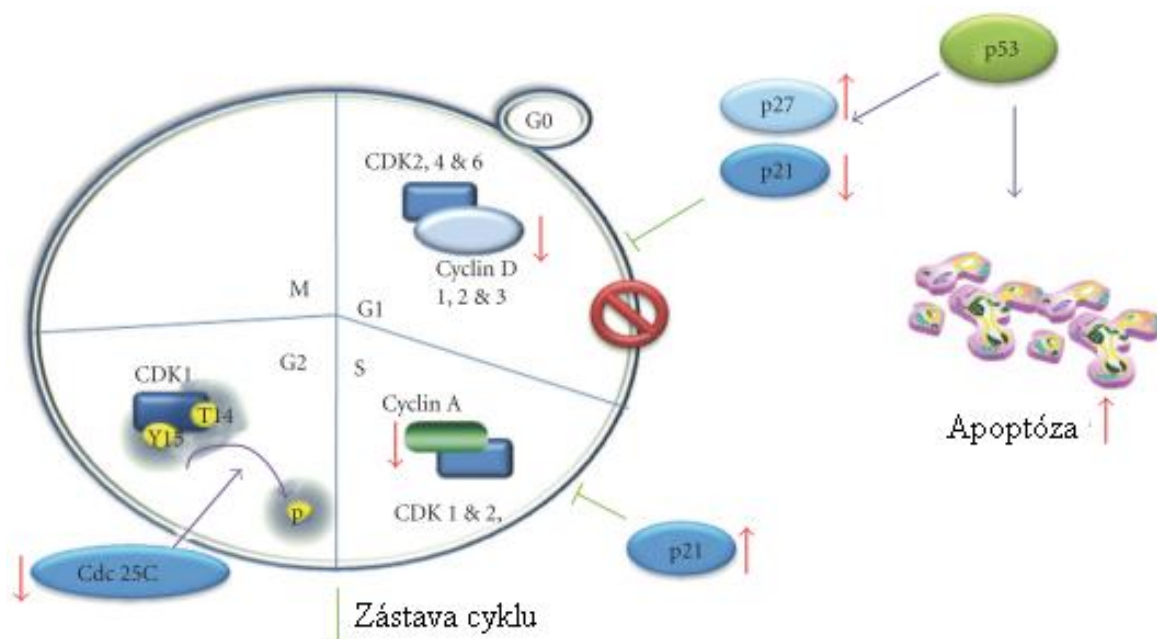
2.1.4.1 Zástava buněčného cyklu

Buněčný cyklus se skládá z interfáze a vlastního buněčného dělení – mitózy. Interfáze se skládá z několika přípravných fází. Jedná se o G1 fázi (postmitotická fáze), ve které dochází ke kontrole DNA, S fázi, během níž se DNA replikuje a G2 fázi, během které se tvoří buněčné struktury. Nedělící se buňky se nacházejí v G0 fázi. Buněčný cyklus má dva kontrolní body a v obou případech se kontroly účastní i protein p53. Samotný přechod buňky do další fáze je řízený různými cyklin-dependentními kinázami (Cdk). První kontrolní bod se nachází na konci G1 fáze. Za normálních okolností je tento krok regulován supresorovým proteinem Rb (Retinoblastoma protein) [41]. Pokud ale byla buňka vystavena působení stresových faktorů, aktivuje se protein p53, který vyvolá expresi proteinu p21, zástavu cyklu a opravu poškozené DNA. V případě rozsáhlejšího poškození buňky indukuje apoptózu. Druhý kontrolní bod se nachází na konci G2 fáze, tedy těsně před vstupem buňky do mitotické fáze, a p53 zde opět za určitých okolností může vyvolat zástavu buněčného cyklu a umožnit tak postreplikační opravy.

Při poškození buněčné DNA dojde působením ATM kinázy k fosforylaci, ke zvýšení koncentrace a aktivity proteinu p53 a k zástavě buněčného cyklu [42]. Aktivovaný protein p53 stimuluje transkripci proteinu p21, který má dvě úlohy. První funkcí je, že inhibuje cyklin-dependentní kinázy cdk2, cdk3, cdk4 a cdk6, čímž brání přechodu buňky z G1 fáze do S fáze (Obrázek 4). Také blokuje aktivitu PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) a tím inhibuje DNA replikaci v S-fázi [43]. G1 fáze buněčného cyklu je řízena cykliny D a E. Funkce cyklinů D je spojena s Cdk4 a Cdk6, zatímco funkce cyklinu E je spojena s Cdk2. Uvedené komplexy cyklin/cyklin-dependentní kinázy fosforylují a tím inaktivují protein retinoblastomu, který řídí přechod z G1 do S fáze [44].

Exprese genu p21 je kontrolována proteinem p53. Promotor genu p21 obsahuje vazebné místo pro protein p53. Navázáním proteinu je transkripce aktivována a p21 zprostředkovává p53 dependentní zástavu buněčného cyklu v G1 fázi v odpovědi na různé stresové stimuly [45]. Koncentrace proteinu p21 může být ale regulována i mechanismy, které na p53 nezávisí, jako například aktivace p21 proteinem BRCA1 (Breast Cancer 1) [46].

U některých buněk dochází k poškození DNA až během G2 fáze. Proto je prováděna kontrola i na jejím konci, aby buňka s poškozenou DNA nemohla vejít do mitotické fáze. V tomto kontrolním bodě je také prováděna kontrola opravené DNA z G1/S kontrolní fáze. Přestup z G2 do M fáze je kontrolován několika mechanismy, z nichž jeden vede i přes p53. Ten je schopný v případě potřeby inhibovat Cdk2, která zajišťuje vstup do M fáze. Pro vstup do M fáze je také důležitý cyklin B1, na který se Cdk2 váže a jehož expresi je p53 schopný potlačit [37].



Obrázek 4: Zástava buněčného cyklu v G1 fázi zprostředkovaná p53, upraveno [47]

2.1.4.2 Indukce apoptózy

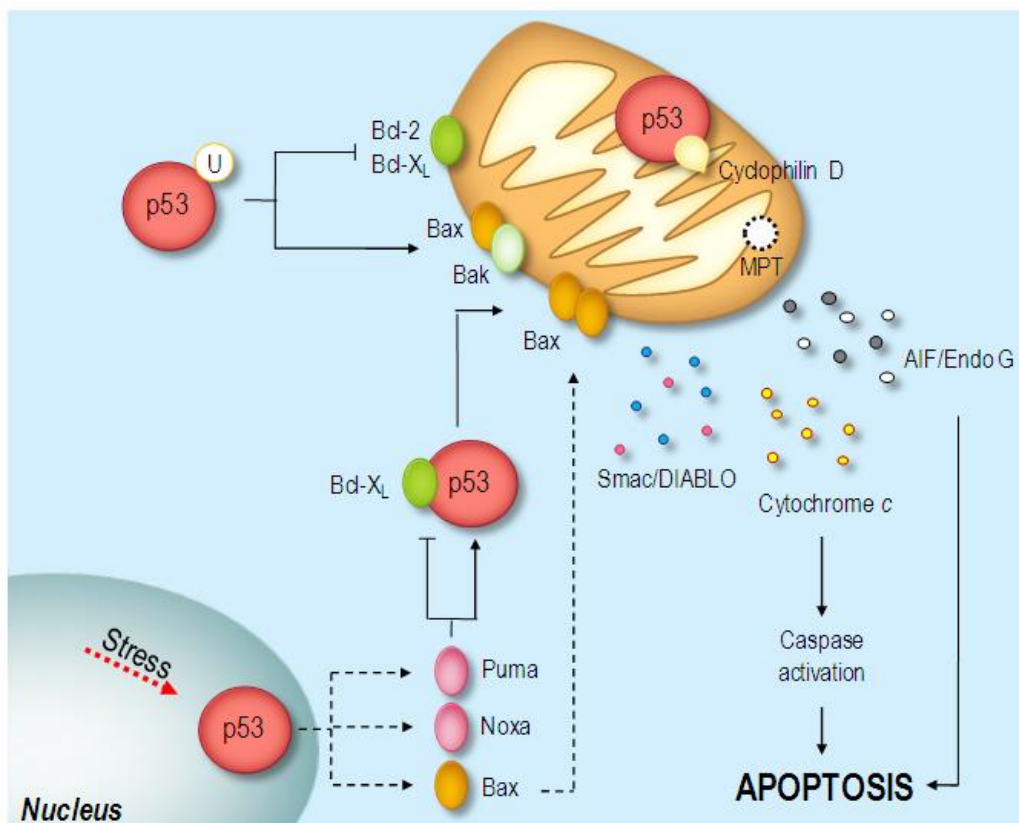
Apoptóza je geneticky programovaná buněčná smrt, na které se buňka sama podílí. Jde o fyziologický proces, který udržuje rovnováhu mezi buněčným růstem a smrtí. Může k ní dojít také v případě, že je buněčná DNA poškozená do takové míry, že již není možné ji opravit.

V případě vážného poškození DNA protein p53 indukuje syntézu proteinu BAX [48]. Ten inhibuje funkci proteinu Bcl-2 (Bcl - B-cell lymphoma), který apoptózu reprimuje (Obrázek 5). Bcl-2 proteiny slouží jako regulátory propustnosti vnější mitochondriální membrány. Když je represor inaktivní, je apoptotická dráha aktivována [49]. Samotná apoptóza je zprostředkována proteázami kaspázami.

Další možností indukce apoptózy skrze protein p53 je přes proapoptotický protein PUMA, který je také lokalizovaný na mitochondriích. Tento protein je schopný interagovat s antiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 pomocí BH3 domény. Za normálních podmínek je PUMA v buňce exprimován pouze málo. K jeho vyšší expresi dochází až vlivem stresových faktorů pomocí několika různých transkripčních faktorů (tedy p53 není jediným transkripčním faktorem). Zvýšená koncentrace proteinu PUMA vede k uvolnění proteinu BAX z antiapoptotického proteinu Bcl-XL, k jeho konformační změně, oligomerizaci a mitochondriální translokaci proteinu [50]. Samotný apoptotický proces je opět zprostředkován kaspázami.

Na apoptóze zprostředkované proteinem p53 se podílí i další proteiny, z nichž je dobré zmínit alespoň protein Noxa. Jeho indukce ale není striktně závislá na působení p53.

V závislosti na podnětu, který apoptotický proces vyvolal, mohou být aktivovány i jiné dráhy zprostředkované jinými proteiny.



Obrázek 5: Indukce apoptózy v poškozených buňkách prostřednictvím p53 [51]

2.1.4.3 Angiogeneze

Angiogeneze je novotvorba cév. Normální p53 novotvorbu cév inhibuje, ale mutovaný p53 ji naopak podporuje, protože dochází ke snížení exprese trombospodinu, který ve zdravých tkáních angiogenezi tlumí [52].

Zvýšená angiogeneze podporuje vznik nádorů, protože se tak tvoří nové cévy, které nádory vyživují. Hraje důležitou roli nejen u solidních nádorů, ale také u hematologických malignit.

2.1.4.4 p53 a metabolismus

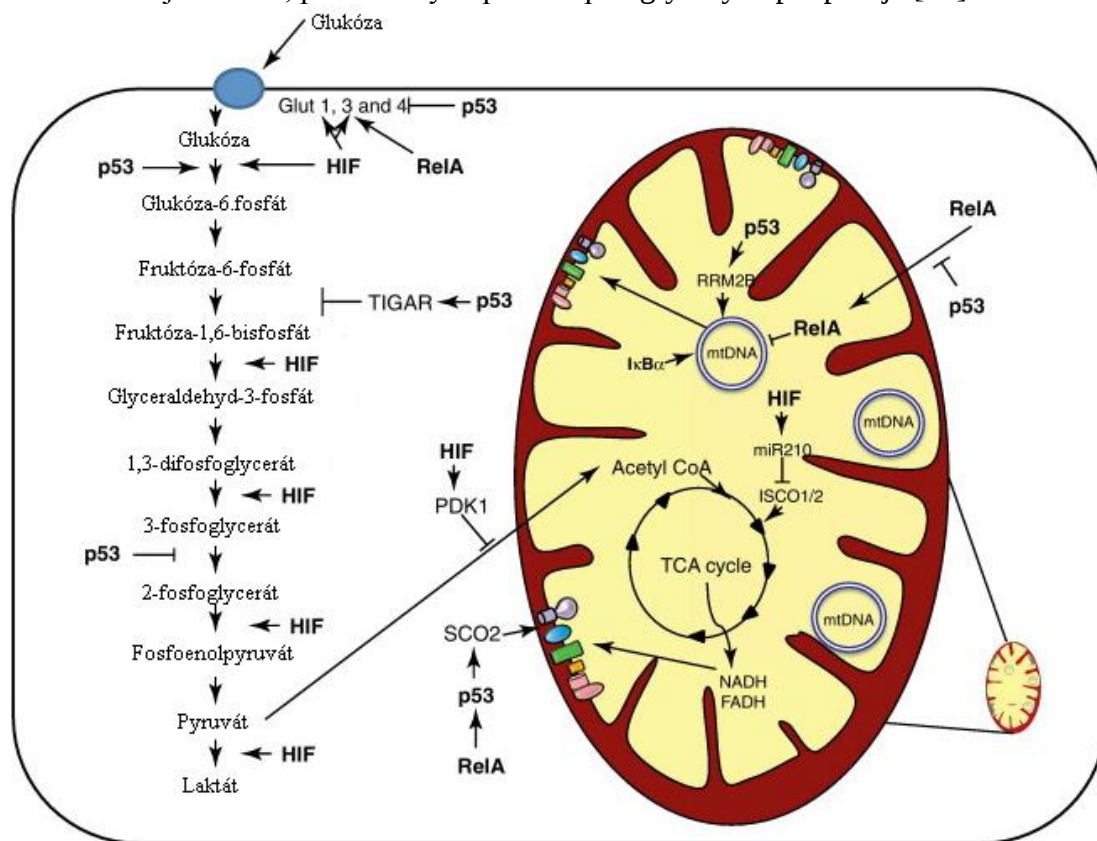
Nádorové buňky mají jiný metabolismus než buňky normální. Například absorpce glukózy je v nádorech podstatně vyšší než v normálních tkáních [53]. Ovšem dlouho byly metabolické změny maligních buněk považovány pouze za vedlejší efekt maligní transformace [54]. Až později se začaly metabolické změny v buňce chápat jako něco, co stojí už na počátku nádorové transformace.

Protein p53 je schopný reagovat na metabolické změny a ovlivňovat metabolické dráhy několika mechanismy a tím oddalovat maligní progresi (Obrázek 6). V podstatě každý stresový signál může aktivovat p53. V tomto případě to znamená, že p53 může být aktivován také sníženým příjmem živin, energie nebo omezeným přístupem kyslíku.

Nedostačující výživové faktory vedou ke znemožnění stimulace AKT-mTOR drah (mTOR - mammalian Target Of Rapamycin), které podněcují nádorovou přeměnu, a k aktivaci AMPK (5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase, enzym důležitý pro energetickou homeostázu), což vede k indukci p53 [55 s. 53]. AKT (nebo také protein kináza B, PKB) a mTOR jsou specifické serin/threoninové kinázy, které se zapojují do procesů glykolýzy, apoptózy, buněčné proliferace, transkripce, buněčné migrace a angiogeneze. Za normálních okolností AKT aktivuje hlavní regulátor p53, protein MDM2, takže v případě jeho inhibice se prodlouží poločas rozpadu p53 a tím se zvýší jeho koncentrace v buňce. Při nedostatku glukózy je také enzym malátdehydrogenáza schopen se navázat a aktivovat p53. Dále může být vazba p53 na DNA ovlivněna skrze ATP, který inhibuje, a ADP, který podporuje tuto vazbu [56], [57]. Také hypoxie vede k aktivaci p53, který často, jako odpověď na nedostatek kyslíku, vyvolá buněčnou smrt. Hypoxie totiž vede ke snížené expresi MDM2, čímž se zvýší aktivita p53 [56]. Dalším metabolickým faktorem aktivujícím p53 je ribozomální stres, protože ribozomální proteiny také váží a aktivují MDM2 [58].

Podle několika studií je p53 schopen regulovat glykolýzu i oxidativní fosforylaci. Bylo objeveno několik mechanismů, kterými může p53 zpomalit glykolýzu – tedy působí proti zvýšení glykolýzy, která je charakteristická pro nádorové buňky. P53 totiž inhibuje expresi glukózových transportérů GLUT1 a GLUT4 (GLUT - Glucose Transporter) [59]. Může také snížit koncentraci fosfoglycerátmutázy, enzymu glykolýzy [60], zatímco dochází ke zvýšené expresi TIGAR (*TP53* Induced Glycolysis And Apoptosis Regulator) [61], který glykolýzu blokuje. Oba dva účinky tedy inhibují různé kroky glykolýzy. Protein p53 je také schopen regulovat glykolýzu nepřímo přes jaderný faktor κ B (NF- κ B) [62].

Ovšem existují i studie, podle kterých p53 naopak glykolýzu podporuje [63].



Obrázek 6: Role p53 v metabolismu [64]

2.1.5 Genová rodina p53

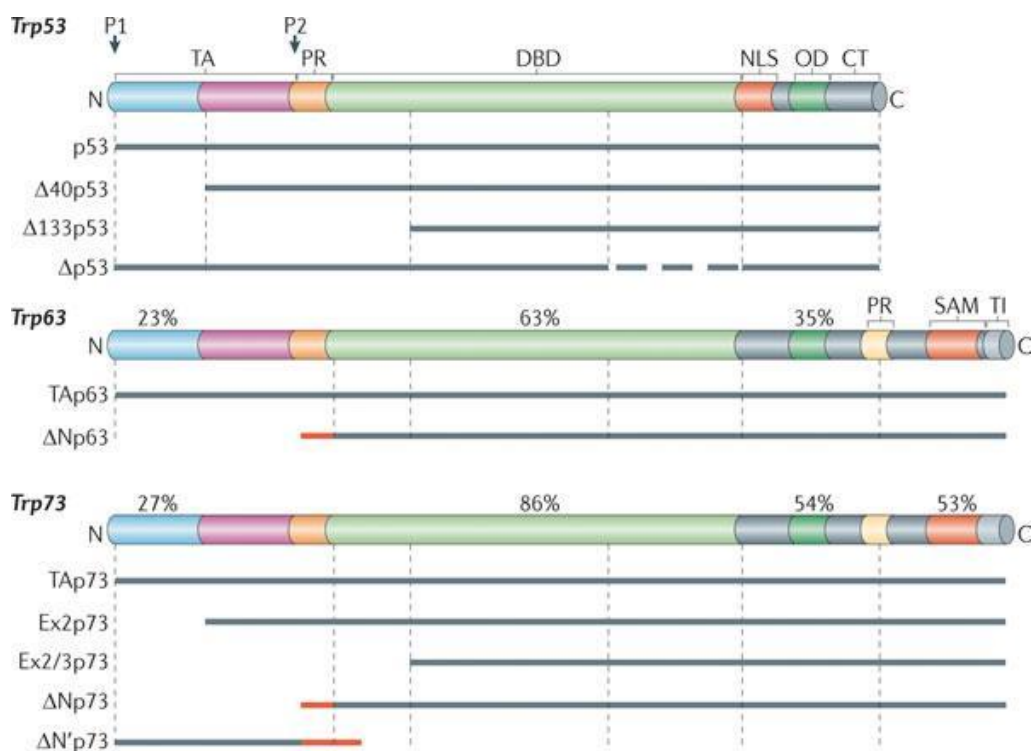
Genová rodina p53 zahrnuje tři geny: *TP53*, *TP63* a *TP73*. To znamená, že tyto tři proteiny savčí rodiny p53 jsou odvozeny triplicací jednoho původního genu [65]. Geny *TP63* a *TP73* byly objeveny roku 1997 [66, 67]. Všechny geny této rodiny exprimují více variant mRNA díky různému sestřihu a několika alternativním promotorům [68]. p63 i p73 obsahují ve své struktuře prodlouženou C-terminální doménu, která v p53 není přítomna a díky které může docházet k alternativním sestřihům a tím ke vzniku několika izoform označených jako p73α-ζ a p63α-γ.

2.1.5.1 Struktura a funkce p63 a p73

Geny *TP73* a *TP63* mají přibližně 65 kb (*TP53* má zhruba 20 kb) a obsahují 14, respektive 15 exonů (p53 jich obsahuje 11). Organizace exonů a intronů je ve struktuře *TP53*, *TP63* i *TP73* vzájemně velmi podobná.

Proteiny p63 a p73 vykazují vysokou homologii s proteinem p53 (Obrázek 7). Nejvíce se shodují ve svých DNA-vazebných doménách, a to v 63 %. V N-terminální doméně je homologie dosaženo přibližně v 22-29 % a C-terminální domény se shodují ve 42 %. Proto i trojrozměrné struktury jednotlivých homologních proteinů jsou vzájemně podobné [69].

Mohou ovšem být exprimovány jako dva různé typy: FL (Full-Lenght) proteiny, které obsahují TA doménu (Transcription Activation) a ΔN proteiny, které tuto doménu postrádají. P63 a p73 obsahují dva promotory (stejně jako p53) – P1 promotor, který produkuje transkripčně aktivní TA proteiny a P2 promotor, který dává vzniknout ΔN proteinům s dominantně negativními funkcemi vůči nim samým a také vůči WT (Wild Type) p53 [70].



Obrázek 7: Struktura genů rodiny p53 a naznačení jejich N-koncových izoform [71]

Proteiny p63 a p73 mají také důležitou úlohu ve vývoji a diferenciaci. Konkrétně p63 je nutný pro vývoj končetin a také pro správnou tvorbu zubů, vlasů, mléčné žlázy, prostaty a potních a slinných žláz. Protein p73 je zase důležitý pro neurogenezi specifických nervových struktur [70].

2.1.5.2 Mutace a rakovina

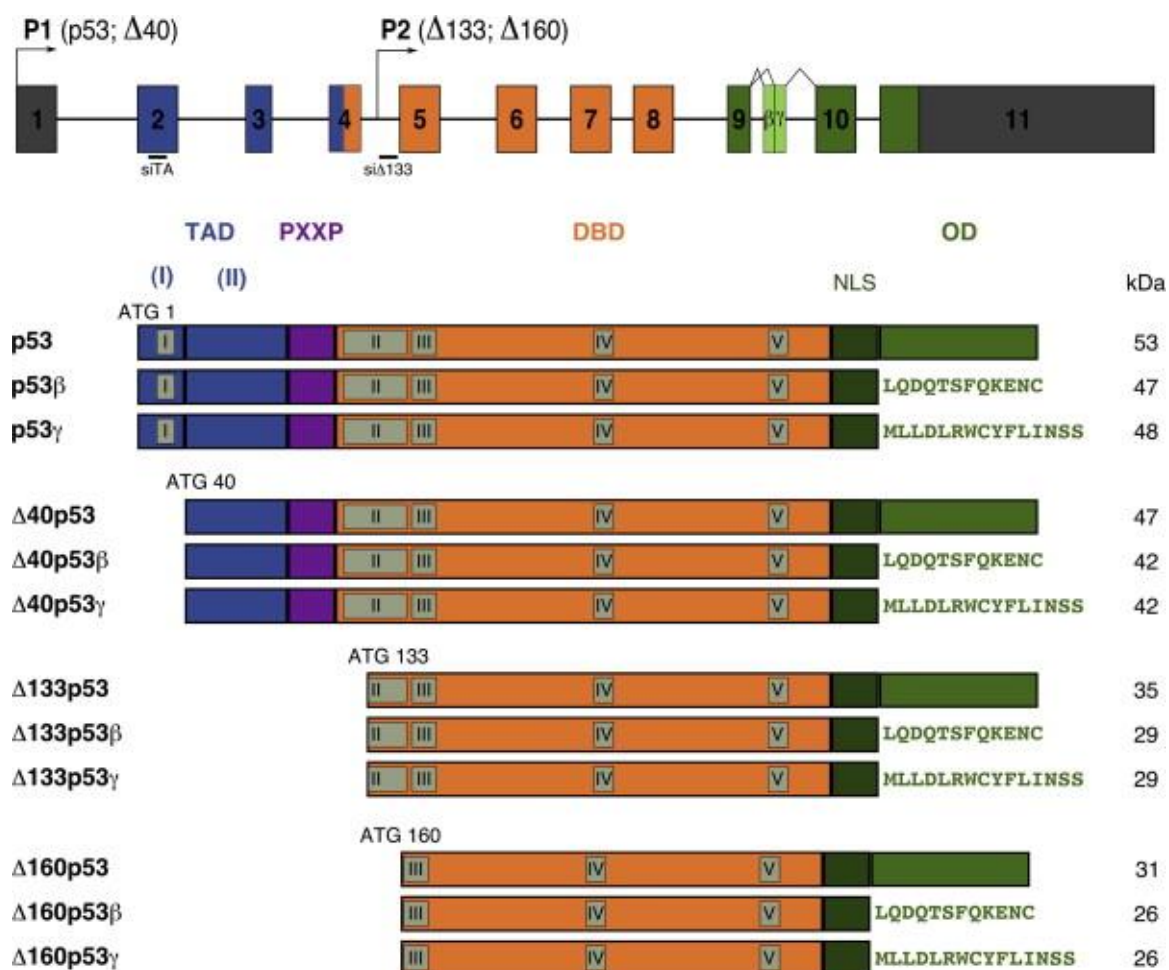
V rakovinných buňkách převládají ΔN izoformy a koncentrace TA izoform je významně snížena. $\Delta Np63\alpha$ je převážně exprimován v řadě nádorových buněk hlavy a krku [72].

Mutace v genu pro protein p63 způsobují šest vzácných autosomálně-dominantních vývojových vad, při kterých pacienti trpí postižením rukou/nohou, vývojovými defekty ektodermálních struktur, rozštěpy, deformacemi uší, abnormalitami urogenitálního systému a nemají dostatečně vyvinuté prsní žlázy a bradavky (zmíněná postižení různě kombinují tyto vady) [65].

Izoformy p73 můžeme v různé míře najít u tumorů močového měchýře, prsu, plic, neuroblastomu a hepatocelulárního karcinomu [73].

2.1.6 Izoformy p53

Lidský gen TP53 exprimuje díky alternativnímu sestřihu, alternativní iniciaci translace a alternativnímu použití promotoru 12 různých p53 izoform. Ve struktuře TP53 jsou přítomny dva promotory (P1 a P2), 4 počátky translace (ATG1, ATG40, ATG133 a ATG160) a 3 alternativní sestřihy C-terminální domény (α , β a γ) [74]. Alternativní sestřih intronu 9 umožňuje vznik tří izoform nesoucích tři různé N-terminální domény (p53 α , p53 β a p53 γ). Přítomnost alternativního promotoru v intronu 4 generuje $\Delta 133p53$ izoformy, kterým chybí transaktivační doména a také část DNA-vazebné domény. Iniciace translace na alternativním AUG kodonu, 40 nebo 160, vede ke vzniku izoform $\Delta 40p53$ a $\Delta 160p53$. Izoformy p53 tedy můžeme rozdělit do čtyř kategorií: TAp53, $\Delta 40p53$, $\Delta 133p53$ a $\Delta 160p53$, kde každá podtřída obsahuje izoformy α , β a γ [75 s. 53] (Obrázek 8). $\Delta Np53$ izoformy, které postrádají transaktivační doménu [76], pozměňují funkci FLp53, mají další, jiné, nezávislé funkce [77] a fungují jako dominantně-negativní represor genů regulovaných p53 [78].



Obrázek 8: Transkripční varianty TP53 [79]

Všechny izoformy se běžně vyskytují ve všech tkáních, ale podstatně více jsou exprimovány v tkáních zasažených rakovinou [80]. Také dosavadní výzkumy ukazují, že jejich přítomnost zvyšuje riziko vzniku rakoviny [75]. Některé p53 izoformy byly také pozorovány v různých tkáních během různých vývojových stádií [78]. Tkáňově-specifická exprese p53 izoform by také mohla vysvětlovat tkáňově specifickou regulaci transkripční aktivity p53 jako odpověď na různé stresové podněty, jako je ionizující záření, UV záření, pH nebo hypoxie [68]. Izoformy mají také různou subcelulární lokalizaci, což opět naznačuje, že každá izoforma má jinou funkci [81].

2.1.6.1 TAp53 izoformy

Skupina TAp53 izoform obsahuje izoformy TAp53 α , TAp53 β a TAp53 γ , z nichž nejvíce pozornosti je věnováno p53 β .

p53 β postrádá oligomerizační doménu [82] a C-terminální regulační doménu [83]. Některé účinky má shodné s p53, ale dosáhne jich působením jiných proteinů. Například bylo zjištěno, že p53 β se přednostně váže na proapoptotický protein Bax a méně na MDM2, zatímco normální p53 se váže především na MDM2 a jen málo na Bax.

Luciferázovým testem bylo zjištěno, že p53 β zvyšuje p53 transkripční aktivitu na promotoru Bax, ale nijak neovlivňuje promotor p21. To může být způsobeno přímou interakcí p53 β s p53, protože tyto dva proteiny jsou schopné spolu tvořit komplex. Výsledky některých studií ukazují, že p53 β je modulátorem p53 tumor-supresorové aktivity, protože je schopný modulovat jeho transkripční aktivitu [81]. Dále podporuje senescenci v normálních fibroblastech [84].

Imunofluorescenčně bylo zjištěno, že p53 β je lokalizován především v jádrech buněk a minimálně také v cytoplasmě [81 s. 53].

Izoforma p53 γ je přítomna ve většině buněk v jádře a v některých buňkách v cytoplasmě. To ukazuje na možnost, že je schopna přesunu mezi jádrem a cytoplasmou a že její subcelulární lokalizace tedy může být regulována [81].

Podobně jako p53 β i p53 γ postrádá oligomerizační doménu [82].

2.1.6.2 $\Delta 40p53$ izoformy

$\Delta 40p53$ izoformy vznikají alternativním sestřihem intronu 2 a postrádají prvních 40 aminokyselin [76]. V literatuře můžeme také nalézt označení p47, p53/47 nebo $\Delta Np53$ [85]. Jak už bylo řečeno dříve, i tato skupina obsahuje izoformy α , β a γ .

$\Delta 40p53$ postrádají část transaktivační domény, což vede k omezení její schopnosti transaktivace [86]. Chybějící část transaktivační domény znemožňuje vazbu MDM2. Degradace $\Delta 40p53$ je tedy řízena jiným mechanismem, který dosud nebyl objasněn. Jeho hladina v buňce se ani nezvyšuje při poškození DNA, což naznačuje, že $\Delta 40p53$ se neúčastní odpovědi na genotoxický stres [85]. Ostatní domény zůstávají shodné s FLp53, takže je zachována také schopnost vázat DNA a regulovat expresi dalších genů. Díky zachování oligomerizační domény může také tvořit komplexy s FLp53 [87].

Podle některých výzkumů $\Delta 40p53$ potlačuje transkripční aktivitu p53 [76] a funguje jako jeho negativní regulátor [85].

Monoubikvitinace $\Delta 40p53$ je spojena s jeho exportem z jádra do cytoplasmy. V přítomnosti $\Delta 40p53$ dochází ke snížené polyubikvitinaci p53 a jeho degradaci a to je provázáno zvýšenou monoubikvitinací p53 a jeho exportem z jádra. $\Delta 40p53$ může tímto způsobem ovlivňovat aktivitu p53. U různých typů nádorů byla zjištěna zvýšená koncentrace p53 v cytoplasmě a tito pacienti měli také horší prognózu [76].

Přestože $\Delta 40p53$ postrádá část transaktivační domény, její schopnost indukovat apoptózu zůstala zachována díky doplňující roli zbylé části TAD a domény bohaté na proliny [88, 89].

2.1.6.3 $\Delta 133p53$ izoformy

$\Delta 133p53$ izoformy vznikají tehdy, je-li využit alternativní promotor v intronu 4. Vzniklé izoformy potom postrádají transaktivační doménu a také část DNA-vazebné domény [75 s. 53]. Tedy $\Delta 133p53$ mají na svém N-konci 132 aminokyselin deletovaných. Jsou schopné inhibovat senescenci v normálních fibroblastech [84].

Z této skupiny je nejvíce diskutovanou izoformou $\Delta 133p53\alpha$, která byla zkoumána v modelovém organismu *Danio rerio* (sladkovodní kaprovitá ryba). *Danio rerio* je v posledních letech velmi často využívaný modelový organizmus, mezi jehož výhody patří

nízká pořizovací cena, levné a snadné udržování během výzkumu a samozřejmě také krátká generační doba [90]. Velkou výhodou je i velké množství embryí, která se vyvíjí mimo tělo ryby a navíc jsou průhledná, takže je možné sledovat embryonální vývoj přímo pomocí mikroskopu. Toho se využívá například při studiu vývojových poruch, ale *Danio rerio* má své využití i v mnoha dalších oblastech výzkumu [91, 92].

Bylo například prokázáno, že $\Delta 133p53\alpha$ moduluje transkripční aktivitu p53 a apoptózu [75, 93]. Její role při růstu nádorového bujení je ovšem zatím neznámá [75]. Pomocí luciferázového testu bylo zjištěno, že kotransfekce $\Delta 133p53\alpha$ spolu s FLp53 inhibuje p53 transkripční aktivitu v promotorech Bax a p21. Také $\Delta 133p53\alpha$ může tvořit komplex s FLp53. Je pravděpodobné, že $\Delta 133p53\alpha$ inhibuje transkripční aktivitu p53 přímou interakcí s FLp53. Exprese $\Delta 133p53\alpha$ izoformy inhibuje replikační stárnutí a podporuje buněčnou proliferaci modulací p53 transkripční aktivity [84].

Podobně jako p53 β je i $\Delta 133p53\alpha$ lokalizován především v jádře a v malé míře také v cytomplasmě [81]. Často bývá nadměrně exprimována v nádorech prsu [82].

$\Delta 133p53\gamma$ je lokalizována v cytoplasmě [81].

2.1.6.4 $\Delta 160p53$ izoformy

Tato izoforma je exprimována od promotoru lokalizovaného v intronu 4 a postrádá ve svém řetězci 159 aminokyselinových zbytků. Byla objevena teprve nedávno a její funkce zatím nejsou dost dobře prostudované [79].

2.1.6.5 Role p53 izoform při vzniku rakoviny

Bylo zjištěno, že izoformy p53 se vyskytují v různých typech nádorů. Jedná se především o nádory prsu, akutní myeloidní leukémii, nádory hlavy a krku, melanomy, nádory vaječníků, renální karcinom a nádory tlustého střeva [83, 94–98]. Nejvíce izoform je exprimováno právě v nádorech hlavy a krku a v nádorech na vaječnicích [95, 97]. Například v prsní tkáni je běžně exprimován p53 a izoformy p53 β a p53 γ . Izoformy p53 tedy mohou jak aktivovat, tak potlačovat aktivitu p53 jako nádorového supresoru, ale jejich abnormální exprese může způsobit ztrátu funkce p53 jako nádorového supresoru v nádorech prsu [81].

V buněčných liniích melanomu a primárních tumorech byly detekovány p53 β a $\Delta 40p53$ izoformy, ale nebyly zjištěny v melanocytech a fibroblastech, což ukazuje, že by mohly hrát roli ve vývoji melanomu [96].

2.1.7 Mutace a delece v genu TP53

2.1.7.1 Inaktivace proteinu p53

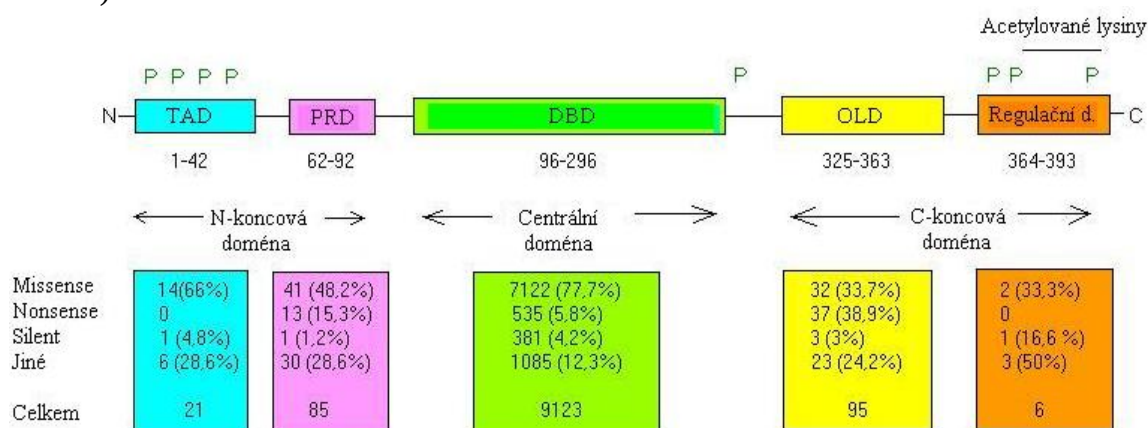
V mnoha případech je příčinou inaktivace p53 mutace nebo delece *TP53*. Předpokládá se, že většina nádorů má nějakým způsobem poškozenou některou signální dráhu p53. K inaktivaci p53 dochází také přímou interakcí p53 proteinu s onkogenními viry, jako jsou

např. SV40 (Simian Virus 40) [5], adenoviry, papilomaviry, virus hepatitidy B a herpesviry HHV1,6,8 (Human Herpes Virus), CMV (Cytomegalovirus) a EBV (Epstein-Barr Virus) [99].

2.1.7.2 Četnost, výskyt a typy mutací proteinu p53

Nádorový supresorový gen *TP53* je mutovaný u více než 50% nádorů [100, 101]. Mutace může být přítomna i přímo v zárodečných buňkách a tak se dědit na potomstvo. Potom se jedná o Li-Fraumeni syndrom (LFS) nebo Li-Fraumeni-like (LFL) syndrom. Jejich nositelům hrozí větší riziko vzniku nádorů.

U většiny mutací p53 se jedná o bodové mutace, kdy dojde k záměně jedné báze a v důsledku toho k zařazení jiné aminokyseliny. Jedná se tedy o missense (měnící smysl kodonu) mutaci. Také může dojít k posunu čtecího rámce, tzv. frameshift mutace, ke ztrátě smyslu kodonu (nonsense), tiché mutaci (silent), případně k mutaci ovlivňující sestřih (Obrázek 9).



Obrázek 9: Mutace p53 v jednotlivých doménách, upraveno [102]

Nejčastěji se mutace objevují v DNA-vazebné doméně, kde způsobují ztrátu schopnosti vázat se na DNA. Ty tedy také mívají nejzávažnější důsledky. V centrální doméně bylo identifikováno 6 míst, na kterých se mutace vyskytují nejčastěji. Jedná se o tzv. „hot spot“ mutace [103] (Obrázek 10). Méně často je mutace přítomna v N- a C-terminálních doménách. Mutace v oligomerizační doméně mohou vést k nesprávné tvorbě tetramerní formy proteinu. Podle přítomnosti mutace v určité aminokyselině DBD domény je lze tedy rozdělit na DNA-vazebné mutanty, kdy mutace znemožňuje navázání cílové DNA. V druhém případě se jedná o strukturní mutace, kdy má protein p53 díky mutaci pozměněnou konformaci [104].



Obrázek 10: „Hot spot“ místa v DNA-vazebné doméně p53, upraveno [28]

Asi 10% mutací p53 jsou teplotně závislé mutace. Jedná se opět o bodové mutace, nejčastěji v DNA-vazebné doméně. Tyto mutace ovlivňují transkripční schopnosti proteinu p53, ale nastavením vhodných podmínek je možné obnovit jeho původní funkci [105].

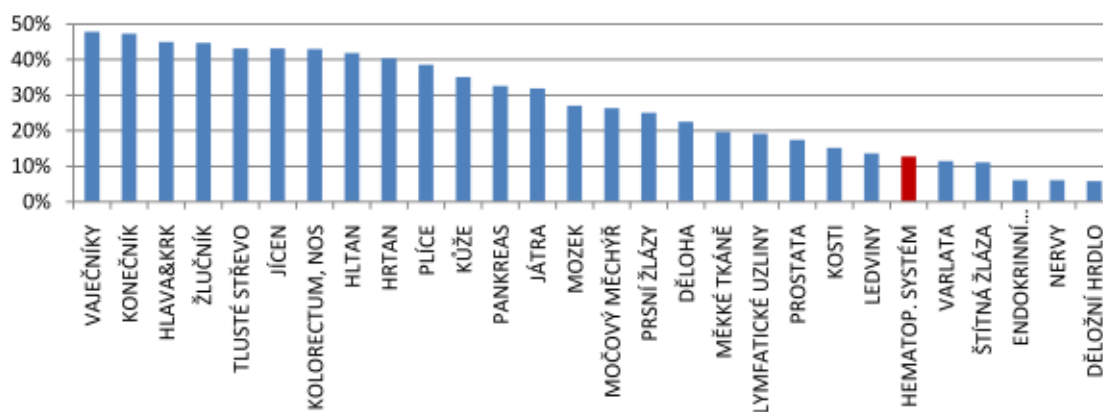
Mutace vedou nejen ke ztrátě funkce p53 jako nádorového supresoru, ale také často mění jeho transkripční schopnosti a dochází k aktivaci jiných genů, které podporují nádorové bujení.

Mutovaný p53 také vykazuje tzv. „gain of function“ fenotyp, což znamená, že dochází k získání onkogenních vlastností. To vede ke zvýšení nádorového potenciálu buněk či k odolnosti tumoru vůči chemoterapeutikům. Pacienti s „gain of function“ mutací p53 jsou k chemoterapii a radioterapii odolnější než pacienti s nádory, kde p53 chybí úplně [106–108]. Mutovaný protein p53 je také schopný inaktivovat další dva členy rodiny p53, proteiny p63 a p73 [109].

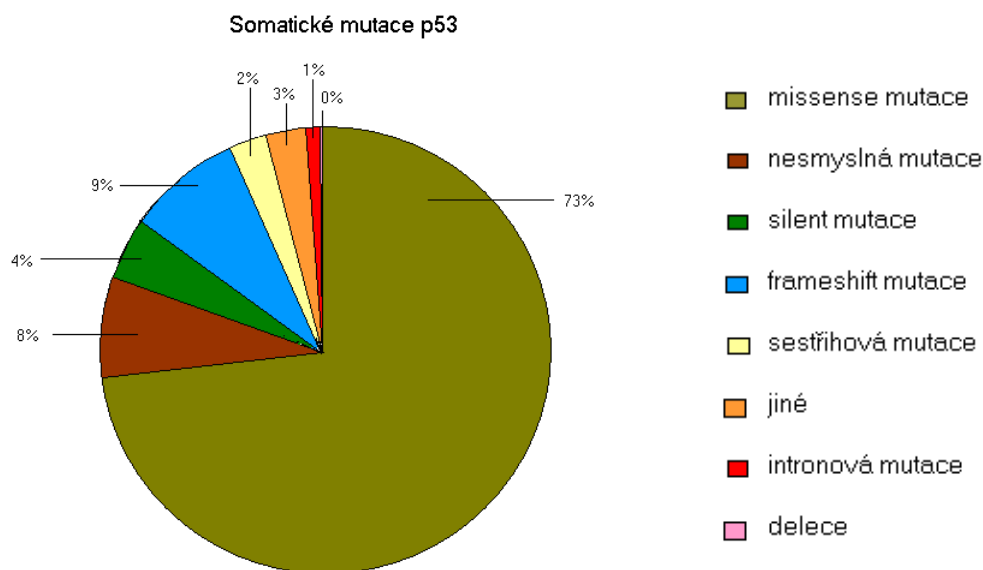
Pokud má p53 plnit správně svoji funkci transkripčního faktoru, musí být lokalizován v jádře. U některých nádorů může dojít k inaktivaci p53 tím, že je místo v jádře lokalizován v cytoplasmě [109].

2.1.7.3 Somatické mutace p53

Drtivá většina všech mutací p53 jsou somatické mutace (Obrázek 11). Somatické mutace jsou způsobeny náhodným vznikem chyb během života v některých genech v určité buňce. Pokud se tato buňka začne nekontrolovatelně dělit, dojde k nahromadění mutovaných buněk, vzniku rakoviny a může dojít také k metastázování do vzdálenějších částí těla. Většina somatických mutací jsou bodové mutace v DNA-vazebné doméně (Obrázek 12).



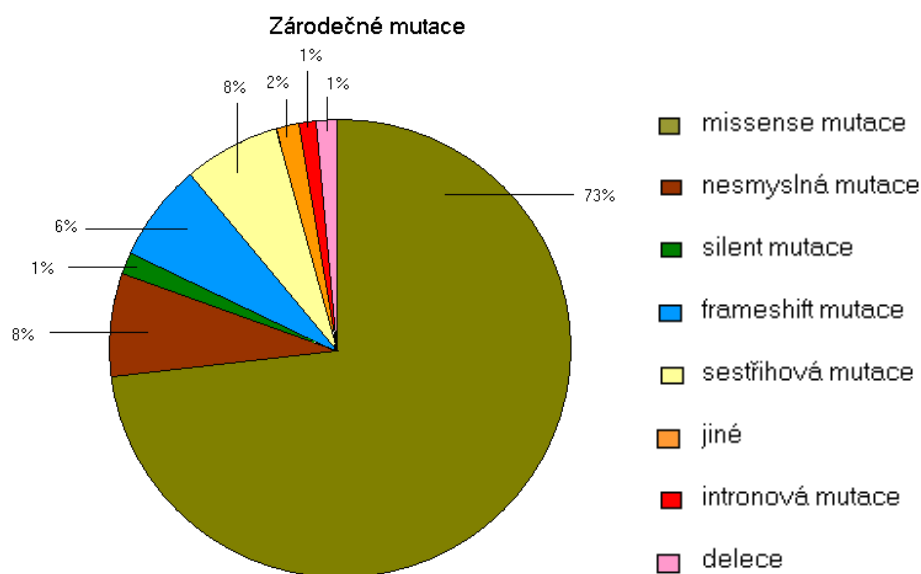
Obrázek 11: Frekvence výskytu TP53 mutací u nejčastějších nádorových onemocnění
Převzato z disertační práce Jitky Malčíkové, upraveno podle z IARC databáze [110]



Obrázek 12: Mutace *TP53* v somatické buňce/26608 mutací, upraveno [100]

2.1.7.4 Zárodečné mutace *p53*

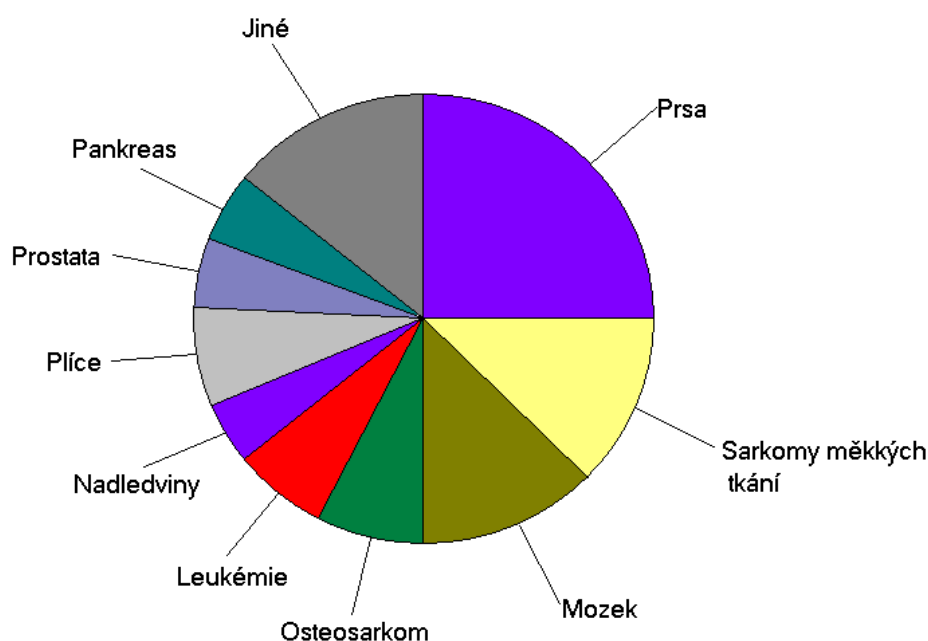
Pokud je mutace genu *TP53* přenesena pohlavními buňkami na potomka a je přítomna ve všech jeho buňkách, potom se jedná o zárodečnou mutaci *p53*. Takto postižení jedinci mají dědičnou predispozici k nádorům způsobeným mutovaným *p53* (Obrázek 13).



Obrázek 13: Mutace *TP53* v Zárodeční buňce/597 mutací, upraveno [100]

Li-Fraumeniho syndrom je vzácné autosomálně dominantní nádorové onemocnění způsobené zárodečnou mutací v genu *TP53*. Popsán byl teprve v 60. letech 20. století. V rodinách, kde se tento mutovaný gen dědí, je zvýšené riziko vzniku maligního onemocnění.

Navíc nádorové onemocnění často propukne v raném věku. Nejčastěji se jedná o sarkomy měkkých tkání a kostí, nádory prsu, mozkové nádory, leukémie, lymfomy a další [111] (Obrázek 14).



Obrázek 14: Nejčastější nádorová onemocnění v rodinách postižených Li-Fraumeniho syndromem, upraveno [112]

Se vznikem Li-Fraumeniho syndromu pravděpodobně souvisí i gen *CHEK2* (22q12.1), který kóduje proteinkinázu regulující buněčný cyklus [113]. Existují ale i další možné genetické změny, které mohou přispívat ke vzniku Li-Fraumeniho syndromu.

Po klinické stránce rozlišujeme dva typy tohoto onemocnění. Prvním typem je klasická forma Li-Fraumeniho syndromu, při které jsou diagnostikovány typické nádory pro LFS u více členů rodiny už v mladém věku. Druhým typem je Li-Fraumeni-like syndrom, kdy se v rodině vyskytují pouze dva z typických nádorů u příbuzných prvního nebo druhého stupně.

2.2 Chronická lymfocytární leukémie

Chronická lymfocytární leukémie, nebo také též lymfatická leukémie (CLL) je nádorové onemocnění bílých krvinek, B-lymfocytů. Ze všech leukémií se právě tato objevuje v západním světě nejčastěji [114]. Onemocnění postihuje především starší populaci od 65-70 let, častěji se vyskytuje u mužů a má u nich také horší prognózu.

Podkladem onemocnění je přeměna zralých lymfocytů v buňky nádorové, které se vyznačují dlouhou životaschopností, a také vyšší schopností replikace než lymfocyty, u kterých k nádorové přeměně nedošlo. Dochází ke klonální proliferaci malých B-lymfocytů s typickým imunofenotypem v periferní krvi, kostní dřeni, lymfatických uzlinách, játrech, slezině či jiných orgánech. Při absenci orgánového postižení je pro stanovení diagnózy nutná přítomnost více než $5 \cdot 10^9/l$ monoklonálních lymfocytů koexprimujících CD5 a CD23

(CD – Cluster of Differentiation) v periferní krvi. Poslední doporučení International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia - sponsored Working Group (IWCLL-WG) z roku 2008 připouští diagnózu CLL i v případě periferní cytopenie a lymfopenie, pokud jsou způsobeny masivní infiltrací kostní dřeně při základním onemocnění [115].

Imunitní odpověď „zdravého“ B-lymfocyty je založena na rozpoznání antigenu receptorem (BCR - B-Cell Receptor). Když se na BCR naváže antigen, B-lymfocyt je aktivován a přemění se na plazmatický B-lymfocyt produkující imunoglobuliny. Po setkání B-lymfocyty s antigenem v sekundárních lymfatických orgánech dochází k somatické hypermutaci BCR (bodovým mutacím v subgenech), jejímž cílem je zvýšit afinitu protilátky k tomuto antigenu. Předpokládá se, že právě antigenní stimulace hraje v patogenezi CLL důležitou roli. Kromě toho k maligní transformaci přispívá také narušení apoptotických drah a vliv mikroprostředí [116].

Charakteristický CLL B-lymfocyt má na svém povrchu exprimovány antigeny CD19, CD20 a CD23, koexprimuje T-buněčný antigen CD5 a současně je méně exprimován CD79b [115].

U 5-10% pacientů s CLL byla prokázána souvislost výskytu CLL s existencí CLL u přímých předků pacienta [117].

2.2.1 Prognostické faktory CLL

Mezi klasické prognostické faktory CLL patří klinické stadium, pohlaví pacienta, odpověď na léčbu, zdvojevací čas lymfocytů, počet prolymfocytů, z nichž dozrávají lymfocyty, typ infiltrace kostní dřeně při histologickém vyšetření a zvýšená hladina laktátdehydrogenázy a beta2-mikroglobulinu. Nově se také zjišťuje exprese CD38 a ZAP 70 (Zeta-associated protein 70), cytogenetické abnormality, mutační stav IgVH genu (gen pro těžké řetězce imunoglobulinů) a mutace p53 [118–123].

Klasifikace podle Raie rozděluje CLL podle několika laboratorních a klinických parametrů (lymfocytóza, počet postižených infiltrovaných lokalit, hodnoty hemoglobinu a trombocytů) do 5 stádií (0, I, II, III, IV a V) [122]. Obdobně Binet rozdělil CLL do 3 stádií (A, B a C) [118, 124]. Obě klasifikace dovedou rozlišit tři základní skupiny pacientů podle prognózy přežití, přičemž vychází z toho, že běžně podávané léky celkové přežití pacientů neovlivňují (Tabulka 1) [118, 122, 124]. Oba systémy se používají dodnes a mají stále významnou vypovídací hodnotu.

Tabulka 1: Prognóza CLL pacientů podle Raie a Bineta [118, 122, 124]

Stadium	Prognóza	Medián přežití (roky)
Rai 0, Binet A	Dobrá	> 10
Rai I+II, Binet	Střední	5-7
Rai III+IV, Binet C	Špatná	< 3-4

Mezi tzv. nové prognostické faktory patří přítomnost chromozomálních aberací (Tabulka 2). U 55 % pacientů s CLL byla zjištěna delece 13q14, v 18 % případů to byla

delece 11q a v 16 % případů šlo o trizomii 12. chromozomu. V 6 % případů byla zjištěna delece chromozomu 17p, který zahrnuje gen *TP53* [125]. Četnost výskytu jednotlivých aberací, zejména 17p delecí, se může lišit v závislosti na stadiu onemocnění. U delece 13q14 je oblast zlomu blízká genu pro retinoblastom (Rb). CLL pacienti s touto jedinou aberací bez delece genu pro retinoblastom mají výrazně lepší prognózu než pacienti s deletovaným genem pro retinoblastom [126 s. 14]. Pacienti s trizomií chromozomu 12 mají atypickou morfologii CLL a jejich prognóza je podle některých studií stejná jako u pacientů s normálním karyotypem, ale podle jiných studií je výrazně horší [127, 128 s. 12]. Delece 11q jsou spojeny s výraznou lymfadenopatií, špatnou odpovědí na léčbu a horší prognózou [129]. Delece 17p jsou spojeny s chemorezistencí, rychlou progresí a špatnou prognózou [130].

Tabulka 2: Chromozomální aberace u CLL a celkové přežití, upraveno [125]

Karyotyp	% pacientů	Medián přežití (měsíce)
Delece 17p	7	32
Delece 11q	18	79
12+ (trizomie 12)	16	114
Normální karyotyp	18	111
Delece 13q	55	113

Lze tedy konstatovat, že delece 17p u CLL nejsou příliš časté, ale poškození tohoto genu vede k agresivnějšímu průběhu onemocnění a k rezistenci na běžnou terapii. Kromě delecí se na 17p mohou vyskytovat v oblasti TP53 také mutace.

Za zmínku určitě stojí skutečnost, že právě vědcům z CMBGT, kde byla zpracována tato diplomová práce, se teprve nedávno podařilo prosadit mezinárodní doporučení pro postupy při určování prognózy chronické lymfocytární leukémie. Doporučení se týkají objasnění významu a způsobů analýzy mutací *TP53* [131]. Dříve se totiž stanovovala pouze přítomnost/nepřítomnost delece krátkého raménka 17. chromozomu, na kterém *TP53* leží. Přitom i přítomnost mutací v tomto genu je provázena špatnou odpovědí na léčbu a horší prognózou.

2.2.2 Léčba pacientů s CLL

CLL patří mezi zatím nevyléčitelná onemocnění. V mnoha případech probíhá bezpříznakově, a proto ne vždy o ní postižený člověk ví. Pokud je CLL u pacienta zjištěna, ale pacient nemá zatím žádné problémy, nemoc se nijak neléčí a lékaři pacienta pouze sledují. Žádná klinická studie dosud nepotvrdila, že včasné zahájení léčby (Rai 0, Binet A) pacientům prospívá. Naopak Dighiero a kol. zaznamenali zvýšený výskyt duplicitních karcinomů u pacientů s časným stadiem CLL, kteří byly léčeni chlorambucilem, ve srovnání s pacienty bez terapie [132].

Indikací k zahájení léčby je aktivní choroba, masivní lymfadenopatie a splenomegalie, zdvojovací čas lymfocytů do 12 měsíců či nárůst počtu lymfocytů o více než 50% za poslední 2 měsíce, progredující anémie a trombocytopenie a autoimunitní cytopenie nereagující na kortikoidy.

Zatím jediným možným řešením, které by mohlo vést ke kompletnímu vyléčení, je alogenní transplantace kostní dřeně. Ta má ovšem riziko zvýšené toxicity a možného úmrtí pacientů [133].

V praxi se zatím nejvíce osvědčila léčba pomocí kombinace dvou cytostatik fludarabinu a cyklofosfamidu a imunoterapie rituximabem (FCR). Cyklofosfamid je alkylační činidlo, které poškodí DNA. Fludarabin je purinový analog bránící opravě poškozené DNA tím, že blokuje syntézu DNA, porušuje její reparační mechanismy, vyvolává depleci ATP, nahromadění fragmentů DNA a apoptózu maligních lymfocytů [134]. Léčba fludarabinem s sebou nese zvýšené riziko rozvoje autoimunitní hemolytické anémie [134] a ve srovnání s chlorambucilem (jedno z nejstarších cytostatik) je také toxičtější. Rituximab je chimerická IgG protilátka proti antigenu CD20, která zprostředkovává buněčnou cytotoxicitu a cytotoxicitu závislou na komplementu, přímo navodí apoptózu a zvýší citlivost maligních B-lymfocytů na terapii [135].

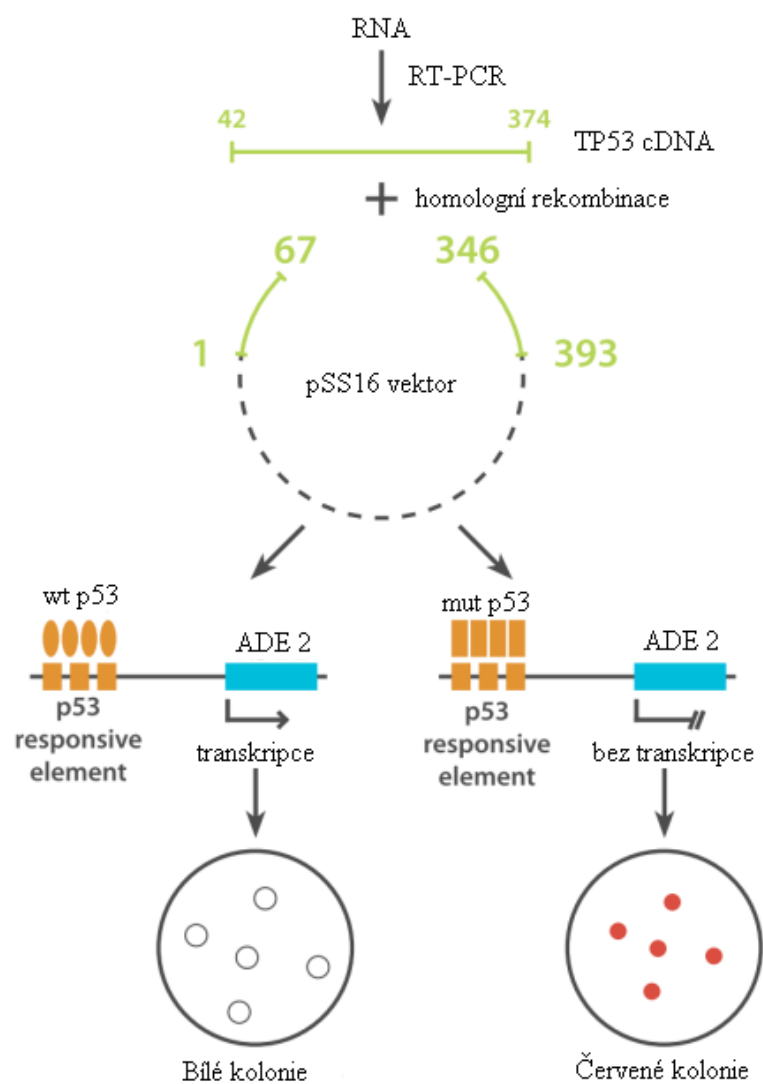
Přítomnost mutace a/nebo delece p53 často vede k rezistenci na terapii FCR. Proto je důležité tento defekt včas zjistit, aby nedošlo k nasazení špatné léčby a tím ke zhoršení stavu pacienta nevhodnou léčbou. U těchto pacientů je proto volena léčba založená na jiném principu než na poškození DNA a indukci apoptózy. Používá se například humanizovaná protilátka proti antigenu anti-CD52 alemtuzumab. I při jejím nasazení je však prognóza pacientů s inaktivací p53 velmi nepříznivá [136]. Antigen CD52 se vyskytuje pouze na B- a T-lymfocytech, monocytech a makrofázích, takže tento preparát nepoškozuje krvetvorné kmenové buňky.

V současné době se nejvíce k léčbě používá alemtumuzab, ale problémem je jeho hematologická toxicita. Léčba skupiny pacientů s poškozeným p53 stále zůstává nejkomplikovanější, a proto se testují látky s mechanismem účinku nezávislým na dráze p53.

2.2.3 Vyšetření p53 u CLL

Jelikož p53 je u CLL významným prognostickým a prediktivním markerem, je stanovení přítomnosti delecí lokusu *TP53* (17p) a také mutací v genu součástí rutinních vyšetření CLL pacientů ve Fakultní nemocnici Brno. Mutace jsou vyšetřovány na Ústavu patologie ve spolupráci s CMBGT pomocí kvasinkové funkční analýzy FASAY [137], [138].

FASAY funguje na principu subklonování a analyzuje tedy jednotlivé p53 molekuly (Obrázek 15). Takto byla v CMBGT zachycena u několika pacientů v jednotlivých kvasinkových koloniích přítomnost izoformy p53 β a také izoformy o 16 nukleotidů kratší, která dosud nebyla v literatuře popsána. Proto bude její detekce součástí experimentální části diplomové práce. Tato kratší izoforma bude v textu označována jako p53 $\beta\Delta 16$.



Obrázek 15: Metoda FASAY: bílé kolonie značí vzorek bez mutace a červené kolonie vzorek s mutací [139]

3 CÍLE PRÁCE

Experimentální část této diplomové práce se zabývá výhradně izoformou p53 β .

1. Optimalizace metody PCR tak, aby podmínky reakce byly ideální pro amplifikaci izoformy p53 β . Zjištění minimální výchozí koncentrace DNA detekovatelné pomocí PCR.
2. Screening přítomnosti p53 β v krvi CLL pacientů a ve vybraných buněčných liniích.
3. Detekce kratší formy izoformy p53 β .

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a soubor pacientů

4.1.1 B-lymfocyty CLL pacientů

Pro analýzu bylo použito celkem 40 vzorků B-lymfocytů pocházejících od 36 pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Všechny vzorky pocházely z Interní hematologické a onkologické kliniky při Fakultní nemocnici Brno a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. U jednoho z CLL pacientů byly do screeningu použity tři vzorky, jejichž odběry a izolace byly provedeny 9 (pacient č. 1b) a 14 (pacient č. 1c) měsíců po prvním odběru (pacient č. 1a). Další tři vzorky pocházely od jiného pacienta z odběrů krve provedených ve stejný den. Každý z těchto tří vzorků byl zpracován jiným způsobem: v prvním případě byly B-lymfocyty separovány ihned po odběru, v druhém případě šlo o mononuklerání buňky zpracované ihned po odběru a třetím vzorkem byly mononukleární buňky po 24h v lednici. V 11 vzorcích byl p53 mutovaný.

4.1.2 B-lymfocyty transformované EB virem

Ve dvou případech byly pro screening použity vzorky B-lymfocytů zdravých dobrovolníků, které byly immortalizovány transformací EB virem (OL 04/06 a ET-EBV).

Jeden vzorek tvořily B-lymfocyty pacienta s Li-Fraumeniho syndromem, které také byly transformovány EB virem (LiFrau).

4.1.3 RNA buněčných linií

Posledních 5 vzorků tvořila RNA 3 buněčných linií odvozených z B-buněčného lymfomu (WSU-NHL, MEC-1 a DHL-4) a RNA 2 buněčných linií odvozených z Burkittova lymfomu (RAMOS a RAJI).

4.1.4 Plazmidy

Pro optimalizaci PCR, jako kontrola pro PCR a pro restriční štěpení byly použity plazmidy pSS16 používané při funkční kvasinkové analýze FASAY obsahující WTp53 o plné délce (13/2), p53 β (41/1, 852/3) a p53 $\beta\Delta$ 16 (363/3) poskytnuté pracovníky CMBGT.

4.2 Použité přístroje

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný materiál a běžné laboratorní pomůcky
- Box na PCR a reverzní transkripci (Biosan, Litva)
- Centrifuga (Eppendorf, Německo)

- Lednice a mrazák pro uchování chemikálií a vzorků (Liebherr, Německo)
- Mikropipety (Eppendorf, Německo)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Termocyklery: XP Cyclor (BIOER, Čína); C1000 Touch™ Thermal Cyclor (Biorad, USA), Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Vortex (Biosan, Litva)
- Zařízení pro elektroforézu: elektroforetická vana, zdroj elektrického napětí pro elektroforézu (Biorad, USA)
- Zkumavky Eppendorf (Eppendorf, Německo)

4.3 Metody

4.3.1 Zpracování krve

Zpracování krve je rutinně prováděno pracovníky CMBGT a nebylo součástí diplomové práce. Přesto jsem si zpracování krve na několika vzorcích vyzkoušela.

Materiál

Periferní krev odebraná do heparinu

Chemikálie a roztoky

- RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (50 μ l / ml krve) (StemCell Technologies)
- RosetteSep Human CD3 Depletion Cocktail (25 μ l / ml krve) (StemCell Technologies)
- 2% FBS v PBS; (FBS - Fetální bovinní sérum, PBS - phosphate buffered saline, fosfátový pufr) (MP Biomedicals, LLC)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare)
- Roztok pro osmotickou lyzi (1x)
- RPMI-1640 (10% FBS; PenStrep)

B-lymfocyty byly separovány z periferní krve odebrané do heparinu pomocí RosetteSep® system (B Cell Enrichment Kit, StemCell Technologies Inc). Vzorek krve byl inkubován s koktejlem vybraných bispecifických protilátek proti povrchovým antigenům hematopoetických non-B buněk (CD2, CD3, CD16, CD36, CD56, CD66b) a proti glycophorinu A, povrchovému antigenu erytrocytů. Buňky nesoucí tyto antigeny tvoří spolu s erytrocyty rozety, které zvyšují jejich denzitu a jsou odstraněny gradientovou centrifugací na Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare). Čistota vzorku byla ověřena průtokovou cytometrií.

4.3.2 Izolace totální RNA

Izolace RNA je rutinně prováděna pracovníky CMBGT a nebyla součástí diplomové práce. Přesto jsem si izolaci RNA na několika vzorcích vyzkoušela.

Materiál

B-lymfocyty získané zpracováním krve

Chemikálie a roztoky

- PBS
- TRI Reagent
- BCP (1-bromo-3-chloropropan)
- Isopropanol
- 75% etanol (připraven naředěním 96% ethanolu)
- Nuclease-free voda (Qiagen)

5-20 milionů buněk je promyto PBS a sediment je důkladně zlyzován v 1 ml TRI reagentu, buněčný lyzát je zamražen ponořením do dusíku a uchován při -80 °C. Po rozmražení na pokojové teplotě je přidán BCP, směs je řádně protřepána a zvortexována a je ponechána stát při pokojové teplotě 1 minutu, během které se od sebe začnou oddělovat fáze DNA (dole), proteinů (uprostřed) a RNA (nahore). Směs je stočena při 4 °C (12000 RCF/16 min), horní fáze (RNA) je přenesena do čisté zkumavky, smíchána s isopropanolem a inkubována 20 minut při -20 °C. Opět je provedena centrifugace při 4 °C (12000 RCF/10 min), supernatant je odsán a zbytek promyt v 75% ethanolu a 1 minutu inkubován. Promytí je provedeno ještě dvakrát, ale už bez inkubace s centrifugací při 4 °C (5 min/7500 RCF). Po poslední centrifugaci je supernatant důkladně odsát a pelet je ponechán 10-15 min schnout. Vysušený pelet je rozpouštěn v Nuclease-free vodě po dobu 1 h při 4 °C, poté zamražen na -80 °C a druhý den je změřena koncentrace a čistota na NanoDropu.

4.3.3 Reverzní transkripce SuperScript II

Reverzní transkripce je enzymová reakce katalyzovaná reverzní transkriptázou, při níž dochází k přepisu genetické informace z molekuly RNA do cDNA (complementary DNA). Metoda je technicky náročnější z důvodu všudypřítomných ribonukleáz.

Materiál

Vzorek: RNA (500 ng/reakci) izolovaná z periferní krve CLL pacientů

Chemikálie a roztoky

- Nuclease-free voda
- Oligo(dT)
- 10mM dNTPs
- Mastermix: 5x First Strand Buffer; 0,1M DTT (Dithiothreitol); RNaseOUT
- SuperScript II

Všechny komponenty jsou součástí kitu SuperScript II kit (Invitrogen). Do každé reakce je napipetována do mikrozkušavky Nuclease free voda, jejíž množství je předem vypočítáno tak, aby doplnilo ostatní komponenty na objem 20 µl; 1 µl oligo(dT); 1 µl 10 mM dNTPs

a 0,5 µg RNA. Mikrozkumavky jsou inkubovány 5 minut při 60 °C v termocykleru a zchlazeny na ledu. Poté je ke každému vzorku přidáno 7 µl master mixu a opět je provedena inkubace 2 minuty při 42 °C. Nakonec je přidán 1 µl SuperScriptu II a směs je inkubována 50 min při 42 °C, následně 15 min při 70 °C a pak jsou vzorky ochlazovány 10 minut při 4 °C. Vzorky cDNA jsou uchovány v lednici do dalšího použití.

4.3.4 Polymerázová řetězová reakce PCR

PCR je tříkroková amplifikační metoda využívající opakované denaturace dvouřetězcové DNA (dsDNA, double strand), následného nasednutí primerů na jednořetězcovou DNA a syntézy nového, komplementárního řetězce.

Materiál

Vzorek: cDNA získaná reverzní transkripcí (2 µl/reakci)

Chemikálie a roztoky

- PCR voda
- Reakčního pufr (10x)
- 10mM dNTPs
- 10 mM primery βF a βR, nebo P3 a P4
- Taq polymeráza (50 U/µl)

Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých komponent v PCR

Reakční komponenta	Objem (µl)	Koncentrace v reakci
Reakční pufr 10x	2	1x
10 mM dNTPs	0,4	0,2 mM/µl
10 mM primery	0,4	0,2 mM/µl
Taq polymeráza	0,1	0,5 U

Všechny komponenty pro PCR jsou součástí kitu a jsou skladovány při teplotě –20 °C. Po jejich rozmrazení a zvortexování (kromě Taq polymerázy, která se nevortexuje) je z nich připravena směs pro PCR. Ta je připravována ve speciálním boxu, vyzářeném UV zářivkou po dobu 20 minut. Pro urychlení přípravy směsi pro PCR je nejprve namíchán master mix, který obsahuje všechny komponenty kromě DNA matrice v množství pro počet testovaných vzorků a pro pozitivní kontrolu (PK), negativní kontrolu bez DNA templátu (NTC – No Template Control) a případně i pro negativní kontrolu s DNA templátem (NK) + 10% jako rezerva pro ztráty při pipetování. Vzorky cDNA jsou přidány do jednotlivých zkumavek až po rozpipetování master mixu. NTC je připravena smícháním směsi pro PCR s PCR vodou, která nahrazuje DNA matici a NK je připravena smícháním směsi pro PCR s plazminem s FLp53 vektorem.

Pro screening CLL pacientů jsou použity primery βF a βR (Tabulka 3), díky kterým je naamplifikován pouze úsek p53β, pokud je ve vzorku izoforma p53β přítomna. Kontrolní reakce kvality přepsané cDNA a přítomnosti p53 (bez ohledu na to, zda byla normální délky, nebo zda jde o p53β) je provedena s primery P3 a P4 (Tabulka 4 a 5, Obrázek 16). Reakční

kroky pro reakci s primery βF a βR jsou součástí úkolu optimalizace PCR pro amplifikaci p53 β , a proto jsou uvedeny až ve výsledcích.

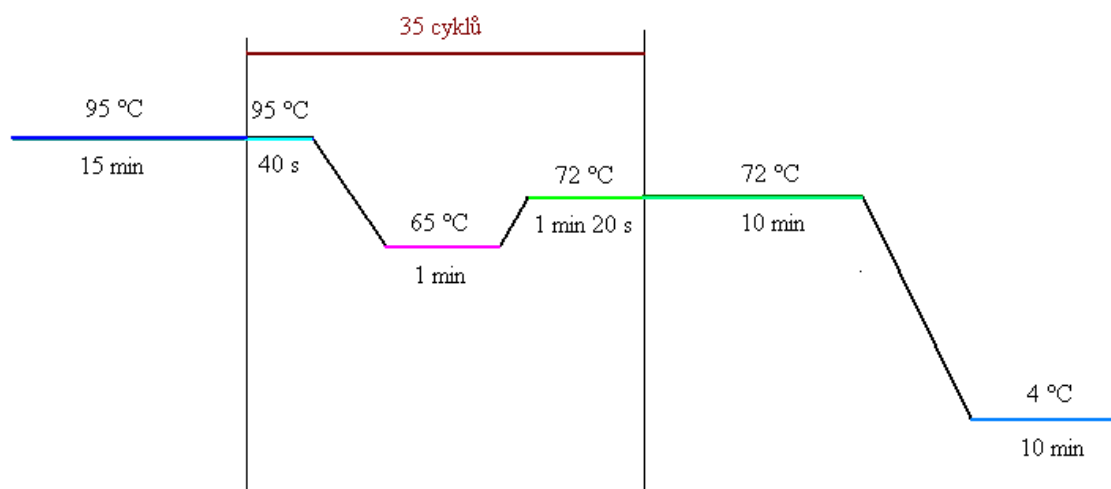
Po skončení programu jsou vzorky buď ihned dále zpracovány, nebo uloženy do lednice do dalšího zpracování.

Tabulka 4: Seznam použitých primerů

Specifita primerů	Název primeru	Velikost PCR produktu
p53 β	βF , βR	177
kontrolní produkt p53	P3, P4	1022
Název primeru	Sekvence primeru	
βF	CCA GAC CAG CTT TCA AAA AGA	
βR	CCT CAT TCA GCT CTC GGA AC	
P3	CCT TGC CGT CCC AAG CAA TGG ATG AT	
P4	ACC CTT TTT GGA CTT CAG GTG GCT GGA GT	

Tabulka 5: Podmínky pro kontrolní PCR s použitím primerů P3 a P4

1. Počáteční denaturace cDNA před prvním cyklem	95 °C	15 min
2. Denaturace	95 °C	40 s
3. Nasednutí primerů (annealing)	65 °C	1 min
4. Syntéza nového vlákna DNA (extenze)	72 °C	1 min 20 s
5. Prodloužená syntéza řetězce poposledním cyklu (konečná extenze)	72 °C	10 min
6. Chlazení	4 °C	10 min
Počet opakování kroků 2. – 4. (počet cyklů)	35	



Obrázek 16: Podmínky pro kontrolní PCR s použitím primerů P3 a P4

4.3.5 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza je separační metoda, která se používá pro rozdělení nabitých molekul podle různé velikosti nebo podle různě velkého elektrického náboje v elektrickém poli.

Materiál

Vzorek: PCR produkt, nebo produkt restrikčního štěpení

Chemikálie a roztoky

- Pufr 1x TBE (TBE – pufr tris-borate- EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Agaróza Sigma nebo Serva pro 1,5% gel
- Agaróza Nusieve pro 3,5% gel
- Ethidium bromid
- Nanášecí pufr 6x Orange (Fermentas - Thermo Fisher Scientific, Litva)
- Žebříček – DNA ladder 100pb (Fermentas, - Thermo Fisher Scientific, Litva)

Pro přípravu 1,5% agarózového gelu je navážena agaróza Sigma nebo Serva a odměřen 1x TBE pufr. Celá směs je důkladně rozpuštěna zahříváním v mikrovlnné troubě, kdy indikátorem dokonalého rozpuštění je čirý roztok bez krystalků agarózy. Homogenní směs je částečně zchlazena pod tekoucí vodou na teplotu cca 60 °C a poté je do ní přidáno interkalační barvivo ethidium bromid v poměru 1:10000. Směs je opět promíchána a homogenizována a nalita do elektroforetické vany, do které je upevněn hřebínek pro tvorbu jamek pro vzorky. Gel se nechá ztuhnout při laboratorní teplotě po dobu 30-40 minut. Po uplynulém čase jsou z gelu vytaženy hřebínky a gel je přenesen do elektroforetické vany naplněné 1x TBE pufrem. Tímto postupem je připraven 1,5% agarózový gel, který je využíván pro separaci PCR produktů. Do jedné jamky jsou napipetovány 4 µl žebříčku a do dalších jamek je napipetováno 5 µl NTC, PK a zkoumaných PCR produktů a případně NK smíchaných s 1 µl nanášecího pufru. Elektroforéza probíhá při 70 V po dobu 30-45 minut. Následně je gel vizualizován pod UVC zářením.

Pro separaci PCR produktů štěpených restrikčním enzymem je použit 3,5% agarózový gel. Elektroforéza probíhá při 70 V po dobu 60 – 90 minut a vizualizace probíhá stejně jako u 1,5% gelu.

4.3.6 Restrikční štěpení

Materiál

Vzorek: PCR produkt

Chemikálie a roztoky

- Restrikční enzym SspI-HF™, 20 jednotek (New England Biolabs)
- 10x NEBuffer 4 (New England Biolabs)
- PCR voda (Agilent, USA)

Do zkumavky je napipetován PCR produkt, enzym a pufr a směs je 1 h inkubována v termobloku při 37 °C. Poté je provedena inaktivace enzymu při 65 °C po dobu 20 min a zchlazení na 4 °C/10 min. Produkty jsou vizualizovány na 3,5% agarózovém gelu.

Sekvence nukleotidů rozeznávaná SspI- HF™: 5' AAT▼ATT 3'
3' TTA▲TAA 5'

4.3.7 DNA čip - Bioanalyzer

DNA čip funguje podobně jako elektroforéza, ale dělení fragmentů probíhá v kapiláře.

Materiál

Vzorek: PCR produkt

Chemikálie a roztoky

- DNA dye (konc.) (Agilent, USA)
- Gel (Agilent, USA)
- Marker 1000 (Agilent, USA)
- DNA Ladder 1000 pb (Agilent, USA)
- PCR voda (Agilent, USA)
- ZAP (Agilent, USA)

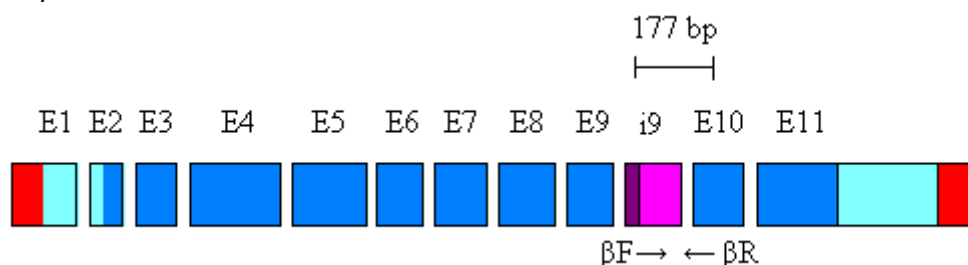
DNA Marker, DNA Ladder a gel jsou vytemperovány při laboratorní teplotě po dobu 30 min ve tmě. Do gelu je přidáno DNA dye a tím vznikne gel-dye mix. Tato směs je zvortexována a přenesena na kolonku a centrifugována při 2240 RCF/15 min. Do označené jamky čipu je napipetováno 9 µl gel-dye mixu, píst je stlačen do spodní polohy, čímž dojde k rozlití gelu do kapilár čipu. Pak je napipetováno po 9 µl směsi gelu do dalších dvou označených jamek. Do jamek pro žebříček a pro vzorky je napipetováno 5 µl markeru a do každé jamky pro vzorky je přidán 1 µl vzorku. Nakonec je napipetován 1 µl žebříčku do jamky k tomu určené. Čip je zvortexován 2400/1 min, elektrody Bioanalyzeru jsou promyty vodou, čip je vložen do Bioanalyzeru a je spuštěn program. Po skončení analýzy je čip ihned vyndán a elektrody jsou opět několikrát promyty vodou a ZAPem.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace PCR pro amplifikaci p53 β

Cílem optimalizace bylo určení specifických podmínek vhodných k amplifikaci izoformy p53 β s použitými chemikáliemi. Důležité bylo nastavit podmínky tak, aby vznikl pouze jediný produkt odpovídající amplifikovanému úseku. Pokud není PCR produkt na gelu dostatečně zřetelný, nebo naopak je vidět více produktů, podmínky reakce nebyly optimální a je třeba je upravit.

p53 β má mezi exonem 9 a 10 inzerci 133 nukleotidů intronu 9. Tyto inzertované nukleotidy obsahují sekvenci, kterou rozeznává primer β F (Obrázek 17). Proto při použití primerů β F a β R dojde k amplifikaci pouze v případě, že je ve vzorku p53 β přítomna. Výsledný produkt p53 β má velikost 177 pb. PCR je tedy navržena pro specifický záchyt izoformy p53 β .



Obrázek 17: Nasednutí primerů β F a β R a naznačení amplifikovaného úseku o 177 pb. Červeně jsou označeny nepřepisované sekvence, světle modrou nekódující přepisované sekvence, tmavě modrou kódující sekvence a fialovou intron 9. "E" je označení jednotlivých exonů, "i" označení intronů.

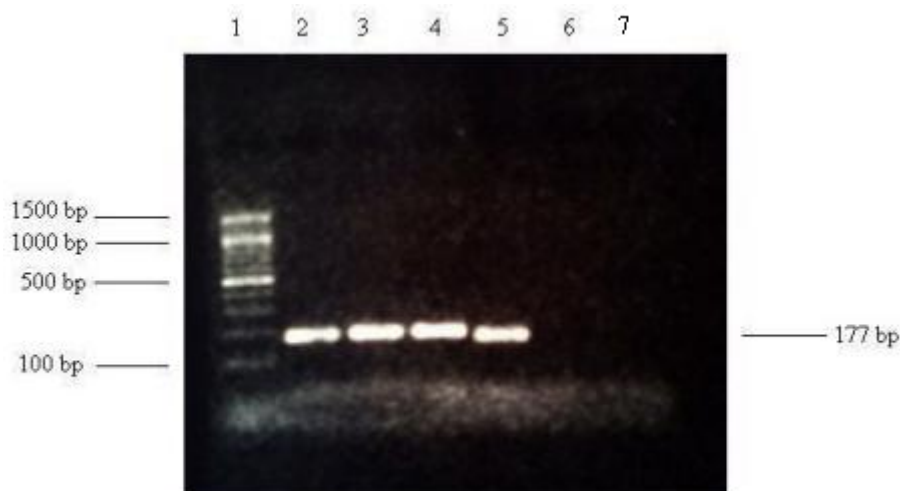
Podmínky pro první pokus byly určeny podle pokynů výrobce polymerázy a podle teploty tání primeru – TM (Tabulka 6).

Tabulka 6: Optimalizace specifické PCR pro amplifikaci p53 β , 35 cyklů

1. Počáteční denaturace cDNA před prvním cyklem	95 °C	15 min
2. Denaturace	95 °C	45 s
3. Nasednutí primerů	53 °C	30 s
4. Syntéza nového vlákna DNA (extenze)	72 °C	30 s
5. Prodloužená syntéza řetězce (konečná extenze)	72 °C	7 min
6. Chlazení	4 °C	10 min
Počet opakování kroků 2. – 4. (počet cyklů)	35	

Pro optimalizaci byly použity plazmidy pSS16 obsahující p53 β . Jako NK s DNA templátem obsahujícím FLp53 byl použit plazmid 13/2.

Ihned po prvním pokusu byl po elektroforéze na gelu dobře zřetelný požadovaný PCR produkt bez jakýchkoliv dalších nežádoucích produktů (Obrázek 18, Tabulka 7).

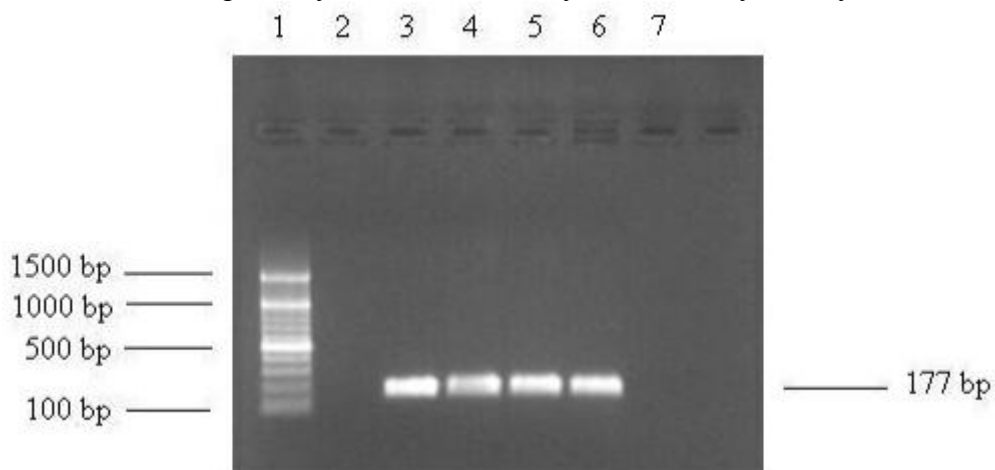


Obrázek 18: Optimalizace PCR pro amplifikaci p53 β , 35 cyklů

Tabulka 7: Optimalizace PCR pro amplifikaci p53 β , 35 cyklů

B ěh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	41/1	+ + +
3	852/3	+ + +
4	62/2	+ + +
5	363/3	+ + +
6	NK	-
7	NTC	-

Vzhledem k dostatečné síle PCR produktu byl snížen počet cyklů z 35 na 30. I po reakci s nižším počtem cyklů byl PCR produkt dostatečně silný (Obrázek 19, Tabulka 8), a proto byl pro další reakce snížen počet cyklů na 30. Všechny ostatní kroky zůstaly nezměněné.



Obrázek 19: Optimalizace PCR pro amplifikaci p53 β , 30 cyklů

Tabulka 8: Optimalizace PCR pro amplifikaci p53 β , 30 cyklů

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	NK	-
3	41/1	+++
4	852/3	+++
5	62/2	+++
6	363/3	+++
7	NK	-

5.2 Zjištění minimálního výchozího množství DNA detekovatelného po PCR na 1,5% agarózovém gelu

Po optimalizaci PCR specifické pro p53 β bylo potřeba zjistit, jaké minimální množství DNA je možné touto metodou naamplifikovat tak, aby byl PCR produkt po elektroforéze ještě dobře zřetelný.

Pro ředění byl použit plazmid 41/1, který obsahoval izoformu p53 β a jehož výchozí koncentrace byla 10 ng/ μ l. Neředěný plazmid byl použit i jako pozitivní kontrola. Jako NK byl opět použit plazmid 13/2, který obsahoval WT FLp53 plné délky a jako PK sloužil neředěný plazmid 41/1. K ředění plazmidu 41/1 byl použit plazmid 13/2.

Pro objektivní výsledky bylo potřeba zjistit počet molekul v 1 μ l výchozího produktu pomocí rovnice:

$$m = \frac{M_m}{N_A} \quad (1)$$

kde m je hmotnost jedné molekuly, M_m je molární hmotnost v g/mol a N_A je Avogadrova konstanta.

Plazmid obsahuje 9200 pb a inzertovaná p53 β obsahuje 177 pb. Celkem tedy plazmid s p53 β obsahuje 9377 pb. Průměrná molární hmotnost 1 nukleotidu je 330 g/mol. Molární hmotnost je vypočítána podle vzorce:

$$M_m = M_{mNK} \cdot N_S \cdot N_B \quad (2)$$

kde M_{mNK} je molární hmotnost 1 nukleotidu v g/mol, N_S značí počet řetězců molekuly DNA a N_B je počet bází. Po dosazení do rovnice (2) získáme:

$$M_m = 330 \cdot 2 \cdot 9377 = 6188820 \frac{g}{mol}$$

Výsledek z rovnice (3) je dosazen do rovnice (1):

$$m = \frac{6188820}{6,023 \cdot 10^{23}} = 10,3 \cdot 10^{-18} g = 10,3 \cdot 10^{-9} ng$$

Počet molekul v 10 ng/μl výchozího produktu byl tedy vypočítán podle rovnice:

$$N_m = \frac{N_{ng}}{m} \quad (4)$$

kde N_m je počet molekul a N_{ng} je počet ng výchozího produktu. Po dosazení do rovnice (4) vyjde:

$$D = \frac{10}{10,3 \cdot 10^{-9}} = 0,97 \cdot 10^9$$

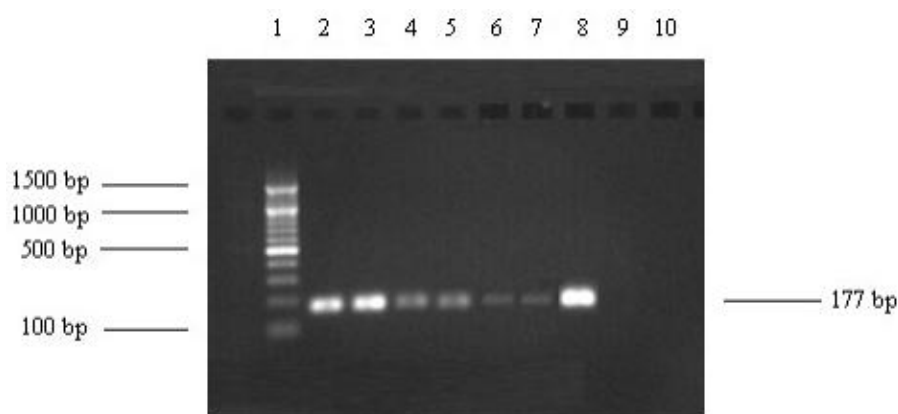
V 1 μl neředěného plazmidu o koncentraci 10 ng/μl je tedy přítomno $0,97 \cdot 10^9$ molekul. Pro další výpočty je tento výsledek zaokrouhlen na $1 \cdot 10^9$ molekul v 1 μl výchozího produktu.

Neředěný plazmid 41/1 byl nejprve naředěn v poměru 1:4 a další ředění byla provedena v poměru 1:1 (Tabulka 9).

Tabulka 9: Ředění plazmidu 1:1 a výsledné koncentrace

Vzorek	Objem 41/1 (μl)	Objem 13/2 (μl)	Výsledná koncentrace (ng/ μl)	Počet molekul plazmidu v 1 μl výchozího produktu
1	1	3	2,5	$250 \cdot 10^6$
2	2	2	1,25	$125 \cdot 10^6$
3	2	2	0,625	$62,5 \cdot 10^6$
4	2	2	0,313	$31,3 \cdot 10^6$
5	2	2	0,156	$15,6 \cdot 10^6$
6	2	2	0,078	$7,81 \cdot 10^6$

Do PCR reakce byl použit vždy 1 μl naředěné směsi. Elektroforéza proběhla na 1,5% agarózovém gelu při 70 V (Obrázek 20, Tabulka 10).



Obrázek 20: Měření minimální detekovatelné koncentrace, ředění 1:1

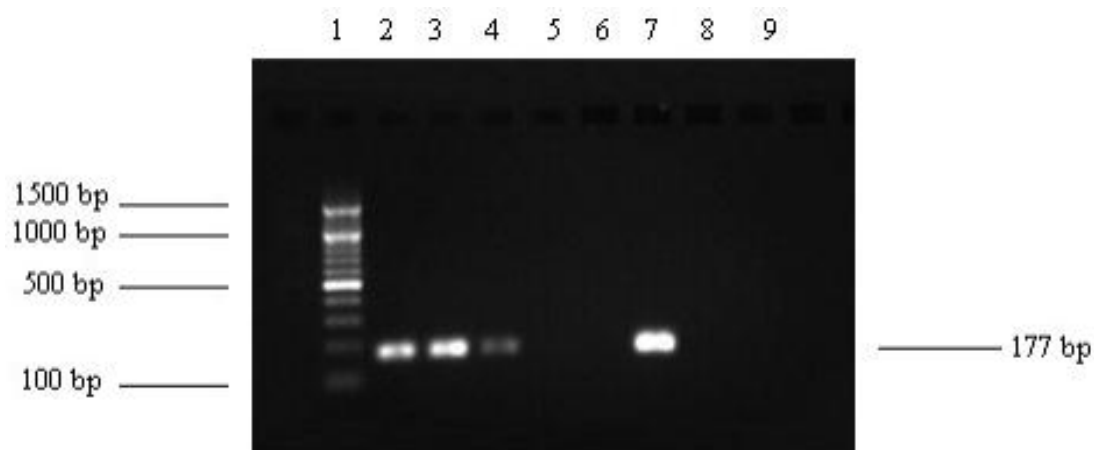
Tabulka 10: Měření minimální detekovatelné koncentrace, ředění 1:1

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	1	+++
3	2	+++
4	3	++
5	4	++
6	5	+
7	6	+
8	PK	+++
9	NK	-
10	NTC	-

Vzhledem k tomu, že všechny koncentrace byly na gelu detekovatelné, proběhlo ještě další ředění, a to ředění plazmidu 41/1 o koncentraci 10 ng/μl desetkrát (Tabulka 11). Elektroforéza proběhla za stejných podmínek jako při předchozím ředění (Obrázek 21, Tabulka 12)

Tabulka 11: Ředění plazmidu 1:10 a výsledné koncentrace

Číslo ředění	Objem 41/1 (μl)	Objem 13/2 (μl)	Výsledná koncentrace (ng/μl)	Počet molekul plazmidu v 1 μl výchozího produktu
1.	0,4	3,6	1,0	$100 \cdot 10^6$
2.	0,4	3,6	0,1	$10 \cdot 10^6$
3.	0,4	3,6	0,01	$1 \cdot 10^6$
4.	0,4	3,6	0,001	$0,1 \cdot 10^6$
5.	0,4	3,6	0,0001	$0,01 \cdot 10^6$



Obrázek 21: Měření minimální detekovatelné koncentrace, ředění 1:10

Tabulka 12: Měření minimální detekovatelné koncentrace, ředění 1:10

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	1	+++
3	2	+++
4	3	+
5	4	-
6	5	-
7	PK	-
8	NK	-
9	NTC	-

Z obrázku 20 je zřejmé, že nejmenší množství výchozí DNA, které je možné amplifikovat pomocí PCR pro p53 β a poté detekovat na 1,5% agarózovém gelu je $1 \cdot 10^6$ molekul.

Dalším ředěním by bylo možné určit minimální množství výchozí DNA ještě přesněji. Dalo by se vyjít z koncentrace plazmidu 41/1 0,01 ng/ μ l a provést další ředění v poměru 1:1. Z praktického hlediska to ale není potřeba.

5.3 Screening p53 β

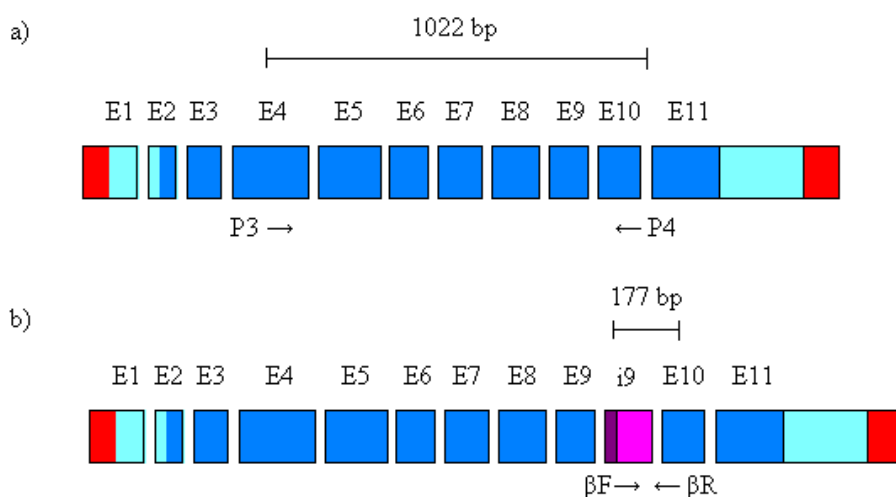
5.3.1 Screening p53 β CLL pacientů v B-lymfocytech

Jitka Malčíková ve své disertační práci uvádí, že spolu s dalšími pracovníky pomocí FASAY (functional analysis of separated alleles in yeast) analýzy identifikovala p53 β v jednotlivých koloniích pacientů s klonálními mutacemi i u pacientů s wt p53 [110]. Přestože byla p53 β popsána už dříve, dosud nebyla provedena žádná studie, která by upřesnila, jak často se p53 β u CLL pacientů vyskytuje. Proto byl součástí experimentálního měření i screening CLL pacientů na přítomnost p53 β .

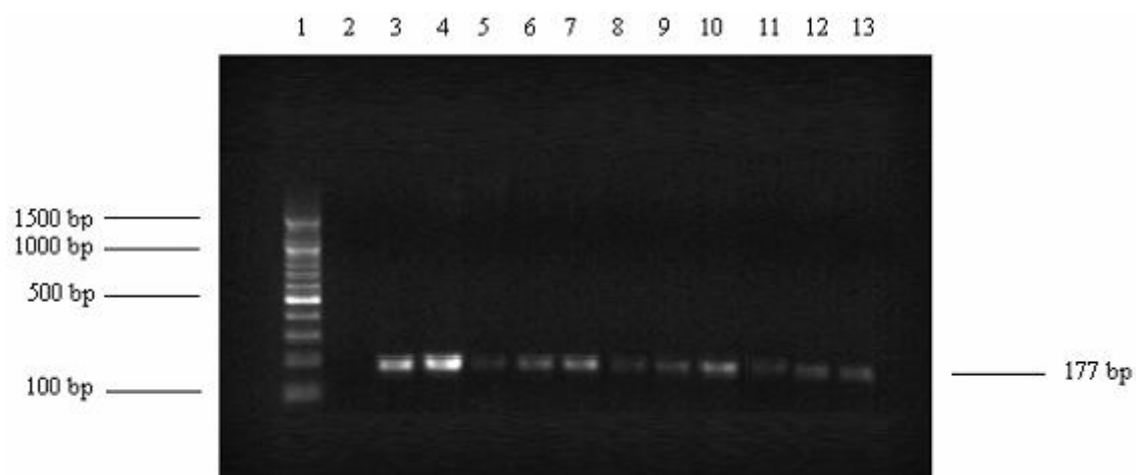
Nejprve byl každý vzorek krve zpracován a poté z něj byla izolována RNA. Ta byla dále přepsána reverzní transkripcí do cDNA, která byla použita do PCR reakce. PCR produkt byl detekován elektroforézou na 1,5% agarózovém gelu s vizualizací pomocí ethidium bromidu. Specifická PCR proběhla s primery β F a β R, které jsou určené k amplifikaci p53 β . Pro kontrolní PCR byly použity P3 a P4 určené k amplifikaci kontrolního produktu (Obrázek 22). Jako pozitivní kontrola byl pro první reakci použit plazmid 41/1 a pro další reakce je jako pozitivní kontrola použit pozitivní vzorek z první reakce.

Na všech fotkách gelů pro všech 40 vzorků CLL B-lymfocytů byly zřetelně vidět PCR produkty. Z toho jednoznačně vyplynulo, že izoforma p53 β byla přítomna ve všech zkoumaných vzorcích bez ohledu na to, zda byl p53 mutovaný, nebo ne. Stejně tak různé zpracování vzorků nemělo na přítomnost izoformy žádný vliv. Jako příklad specifické PCR pro amplifikaci p53 β je zde uvedena jedna fotka gelu (Obrázek 23, Tabulka 13). Kontrolní PCR vyšla pro všechny vzorky také pozitivně (Obrázek 24, Tabulka 14).

Kvantitativně se jednotlivé vzorky obsahující p53 β od sebe vzájemně lišily. Pro přesné kvantitativní stanovení rozdílů exprese by bylo třeba zavést specifickou PCR v reálném čase.



Obrázek 22: a) Nasednutí primerů P3 a P4 na p53 a znázornění amplifikovaného úseku kontrolního produktu o 1022 pb, b) Nasednutí primerů βF a βR a znázornění amplifikovaného úseku p53β o 177 pb. Červeně jsou označeny nepřepisované sekvence, světle modrou nekódující přepisované sekvence, tmavě modrou kódující sekvence a fialovou intron 9. "E" je označení jednotlivých exonů, "i" označení intronů.

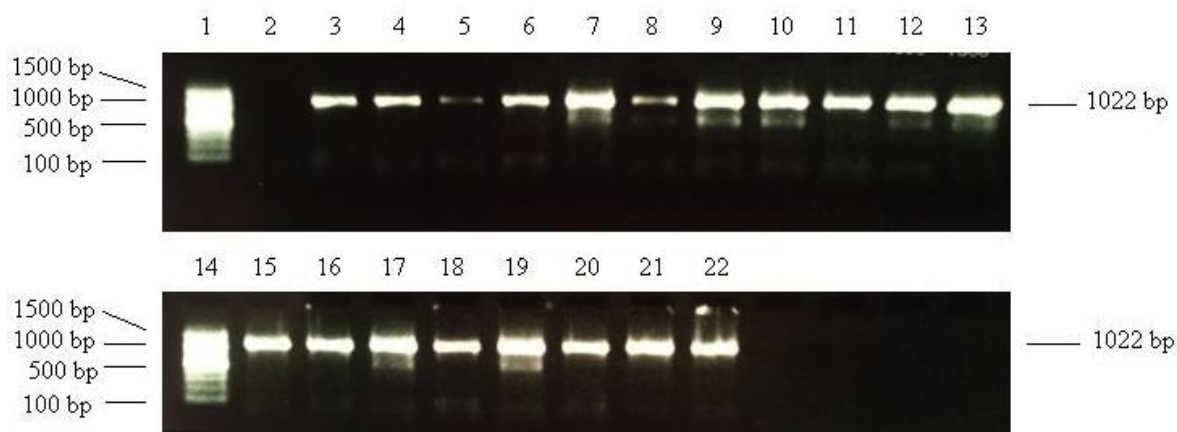


Obrázek 23: Screening p53β v CLL B-lymfocytech s použitím primerů βF a βR

Tabulka 13: Screening p53β v CLL B-lymfocytech s použitím primerů βF a βR

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	NK	-
3	PK	+++
4	Pacient č. 1a, mutace p53	+++
5	Pacient č. 1b, mutace p53	+
6	Pacient č. 1c, mutace p53	++
7	Pacient č. 2	++
8	Pacient č. 3	+

9	Pacient č. 4	+
10	Pacient č. 5	++
11	Pacient č. 6	+
12	Pacient č. 7	+
13	Pacient č. 8	+



Obrázek 24: Kontrolní PCR s použitím primerů P3 a P4

Tabulka 14: Kontrolní PCR s použitím primerů P3 a P4

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	NK	-
3	PK	+++
4	Pacient č. 19a, mutace p53	+++
5	Pacient č. 19b, mutace p53	++
6	Pacient č. 19c, mutace p53	+++
7	Pacient č. 20	+++
8	Pacient č. 21	++
9	Pacient č. 22	+++
10	Pacient č. 23	+++
11	Pacient č. 24	+++
12	Pacient č. 25	+++
13	Pacient č. 26	+++
14	Pacient č. 27	+++
15	Pacient č. 28	+++
16	Pacient č. 29	+++
17	Pacient č. 30	+++
18	Pacient č. 31	+++
19	Pacient č. 32	+++
20	Pacient č. 33	+++
21	Pacient č. 34	+++
22	Pacient č. 35	+++

5.3.2 Screening p53 β CLL pacientů v buněčných liniích

Jak vyplynulo z předchozích výsledků, p53 β byla detekována u všech testovaných CLL pacientů. Výskyt této izoformy byl již dříve popsán v nedělících se buňkách [140] a CLL lymfocyty jsou v periferní krvi zastaveny v G0 fázi. Proto byla v další části práce studována izoforma p53 β v rychle se dělících buněčných liniích. Konkrétně se jednalo o dva vzorky B-lymfocytů zdravých dobrovolníků transformovaných EB virem, jeden vzorek B-lymfocytů pacienta s Li-Fraumeniho syndromem také transformovaných EB virem, 3 vzorky tvořila RNA z buněčných linií odvozených z B-buněčného lymfomu a 2 vzorky RNA buněčných linií odvozených z Burkittova lymfomu. Tyto vzorky byly poskytnuty pracovníky laboratoře.

Ve všech osmi případech byl screening pozitivní (Obrázek 24, Tabulka 15). Jako kontrola kvalitní cDNA a přítomnosti p53 opět sloužila reakce s primery P3 a P4 (Obrázek 25, Tabulka 16).

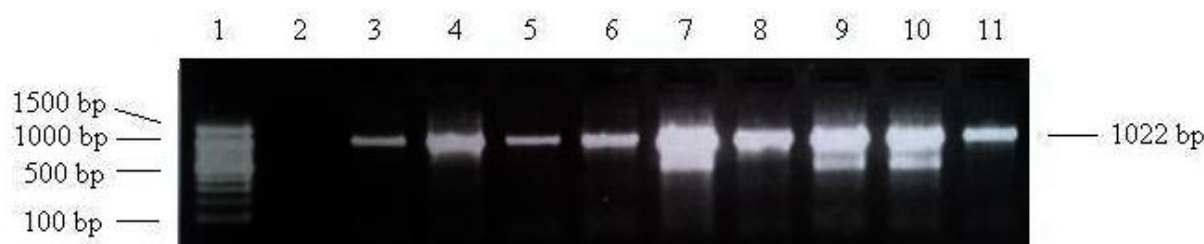
Z výsledků se dá předpokládat, že by p53 β mohla být přítomna ve všech, nebo alespoň ve většině rychle se dělících buněčných liniích. Pro přesnější závěr by ale bylo nutné provést PCR více vzorků buněčných linií. Také by bylo zajímavé provést kvantitativní analýzu, podobně jako u kvantitativní analýzy p53 β v CLL B-lymfocytech.



Obrázek 24: Screening p53 β v buněčných liniích s použitím primerů βF a βR

Tabulka 15: Screening p53 β v buněčných liniích s použitím primerů βF a βR

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	NK	-
3	PK	+++
4	WSU-NHL	+++
5	MEC-1	+++
6	RAMOS	+++
7	RAJI	+++
8	SU-DHL	+++
9	OL 04/06	+++
10	ET-EBV	+++
11	LiFrau	+++



Obrázek 25: Kontrolní PCR s použitím primerů P3 a P4

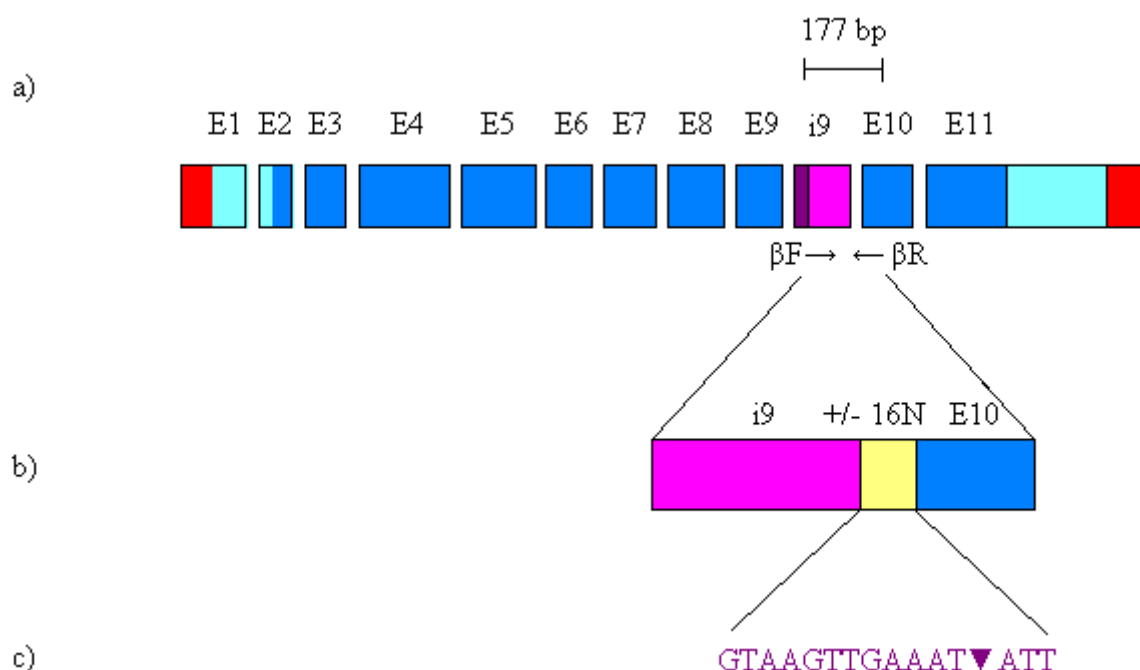
Tabulka 16: Kontrolní PCR s použitím primerů P3 a P4

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	NK	-
3	PK	++
4	WSU-NHL	+++
5	MEC-1	++
6	RAMOS	++
7	RAJI	+++
8	SU-DHL	+++
9	OL 04/06	+++
10	ET-EBV	+++
11	LiFrau	++

5.4 Restrikční štěpení vybraných PCR produktů – detekce p53βΔ16

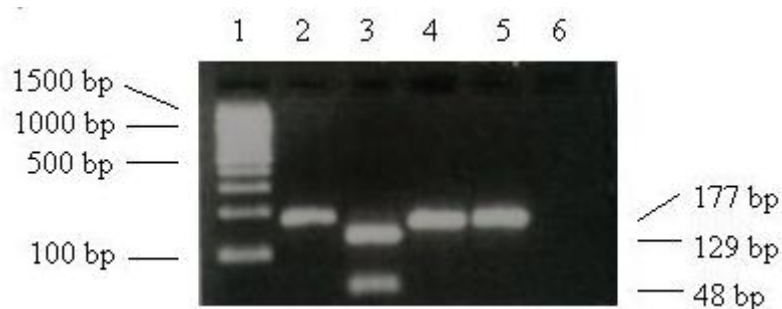
Kromě izoformy p53β byla pomocí FASAY v CMBGT zachycena i přítomnost p53β, kratší o 16 nukleotidů. Tato izoforma nebyla dosud v literatuře popsána. Pracovně jsme ji nazvali p53βΔ16 a cílem této části práce bylo ověřit její přítomnost u CLL pacientů.

PCR produkty p53β a p53βΔ16 lze od sebe rozlišit naštěpením pomocí restrikčního enzymu SspI-HF™. Ten totiž rozeznává a štěpí sekvenci nukleotidů, která se nachází uvnitř sekvence 16 nukleotidů deletovaných u p53βΔ16 (Obrázek 26). V případě, že p53β tyto nukleotidy obsahuje, naštěpí restrikční enzym PCR produkt na dva produkty, které jsou po agarózové gelové elektroforéze vidět jako dva proužky (delší produkt se 129 pb a kratší produkt se 48 pb). Pokud PCR produkt nukleotidy postrádá, na gelu se objeví pouze jeden neštěpený produkt (177 pb).



Obrázek 26: a) Nasednutí primerů βF a βR a znázornění amplifikovaného úseku o 177 pb, b) Amplifikovaný úsek p53 β +/- 16N, c) Sekvence 16 nukleotidů u p53 β s naznačeným restrikčním místem. Červeně jsou označeny nepřepisované sekvence, světle modrou nekódující přepisované sekvence, tmavě modrou kódující sekvence, fialovou intron 9 a žlutou. 16 hledaných nukleotidů. "E" je označení jednotlivých exonů, "i" označení intronů.

Restrikční štěpení bylo nejprve provedeno pro plazmid 41/1, u kterého bylo známo, že obsahuje kompletní sekvenci nukleotidů, a pro plazmid 363/3, který obsahoval potenciální izoformu p53 $\beta\Delta 16$ (Obrázek 27, Tabulka 17).



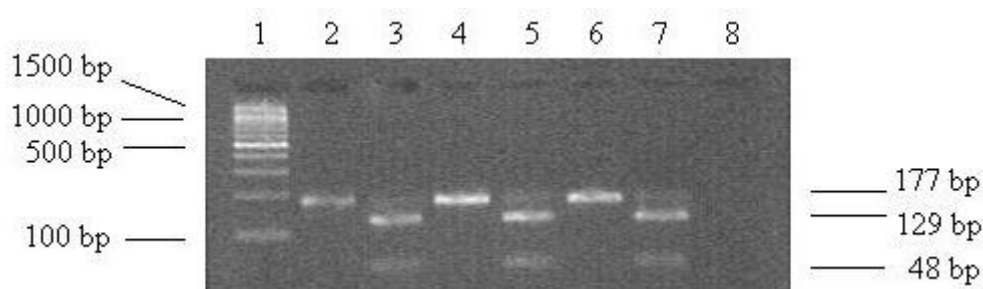
Obrázek 27: Restrikční štěpení plazmidů se známými sekvencemi nukleotidů

Tabulka 17: Restrikční štěpení plazmidů se známými sekvencemi nukleotidů

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	41/1, neštěpený	1 produkt
3	41/1, štěpený	2 produkty
4	363/3, neštěpený	1 produkt

5	363/3, štěpený	1 produkt
6	NTC	-

Potom bylo štěpení provedeno u tří vzorků pacientů, u nichž dosud nebylo známo, zda obsahují p53 β Δ 16, nebo ne. U všech tří vzorků byly na gelu po štěpení zřetelné dva produkty, což znamená, že amplifikované úseky byly naštěpeny (Obrázek 28, Tabulka 18). Kromě dvou zřetelných produktů byl mírně patrný i produkt původní délky 177 pb. Vzhledem k tomu, že nebylo zcela jasné, zda se jedná o nedoštěpený PCR produkt, nebo zda jde o p53 β 16, jejíž existence ovšem dosud nebyla prokázána, byla provedena vizualizace pomocí Bioanalyzeru, který má vyšší rozlišovací schopnost než agarózová gelová elektroforéza a dokáže oddělit produkty lišící se pouhými 16 nukleotidy.



Obrázek 28: Restrikční štěpení vzorků s neznámými sekvencemi nukleotidů

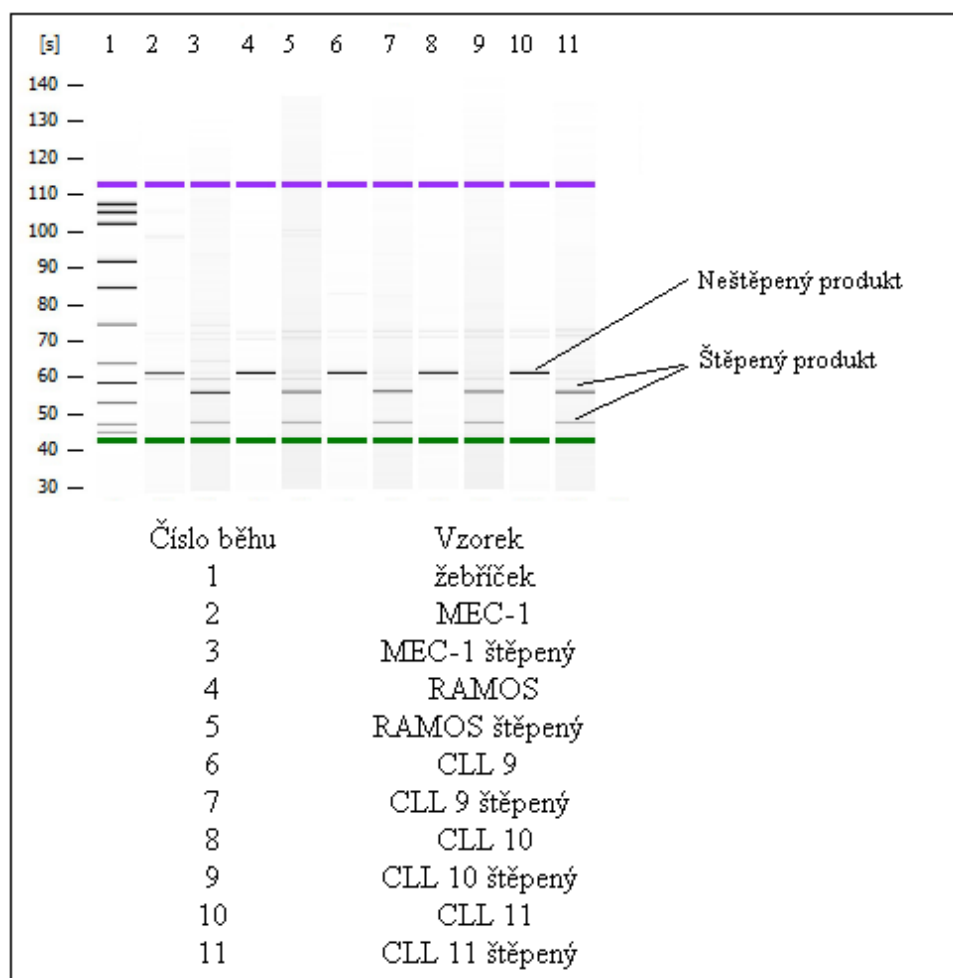
Tabulka 18: Restrikční štěpení vzorků s neznámými sekvencemi nukleotidů

Běh	Vzorek	PCR produkt
1	100 bp žebříček	-
2	Vzorek č. 1, neštěpený	1 produkt
3	Vzorek č. 1, štěpený	2 produkty
4	Vzorek č. 2, neštěpený	1 produkt
5	Vzorek č. 2, štěpený	2 produkty
6	Vzorek č. 3, neštěpený	1 produkt
7	Vzorek č. 3, štěpený	2 produkty
8	NTC	-

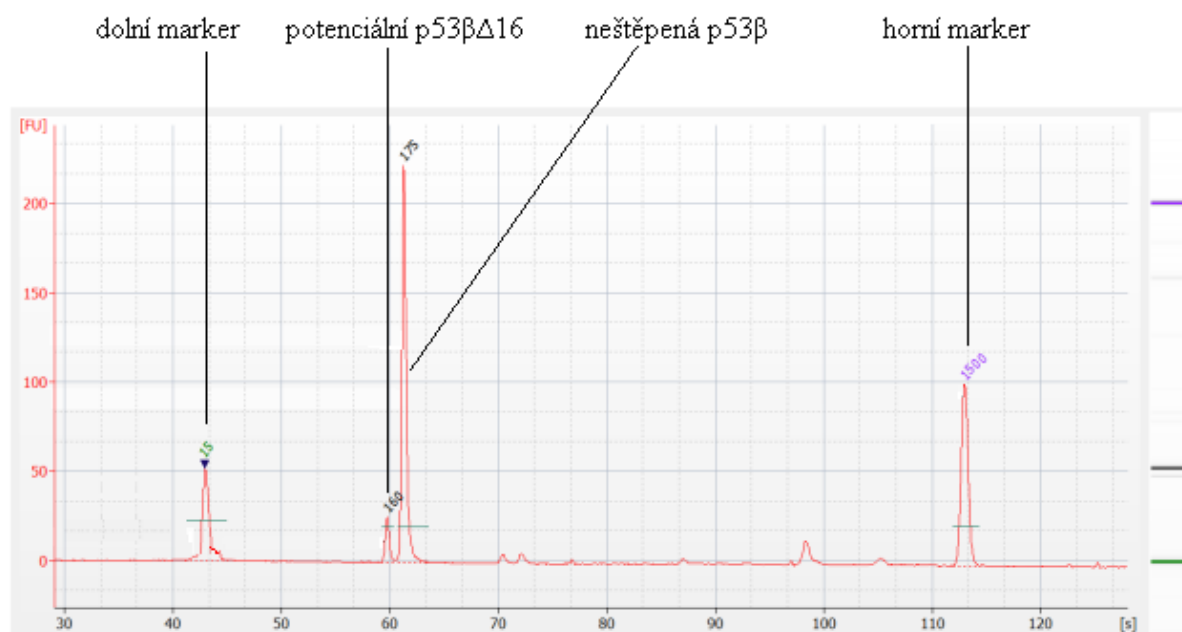
5.5 Analýza pomocí Bioanalyzeru

Pro analýzu pomocí Bioanalyzeru (Agilent 2100 Bioanalyzer) bylo náhodně vybráno 6 PCR produktů: 3 vzorky buněčných linií WSU-NHL, MEC-1 a RAMOS a 3 vzorky CLL pacientů (vzorky číslo 9, 10 a 11).

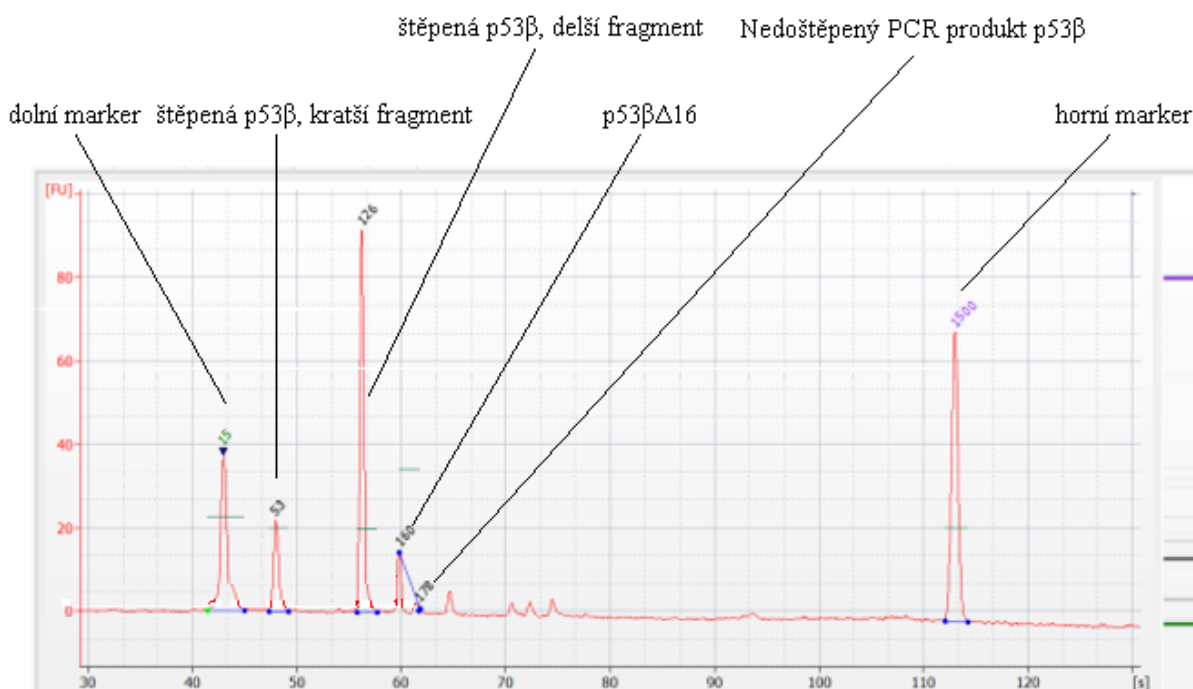
PCR produkty byly restrikčně naštěpeny a analyzovány pomocí Bioanalyzeru. Výsledek lze zobrazit podobně jako při elektroforéze (Obrázek 29), případně jako grafická závislost fluorescence na čase (ukázky jsou na Obrázku 30 a 31). Vzorky byly řazeny párově za sebou, kdy jeden pár byl vždy tvořen neštěpeným a štěpeným produktem. Z obrázku je vidět, že u všech vzorků došlo ke štěpení.



Obrázek 29: Výstup elektroforézy z Bioanalyzeru



Obrázek 30: Elektroforeogram neštěpeného vzorku MEC-1



Obrázek 31: Elektroforeogram štěpeného vzorku MEC-1

Neštěpený amplifikovaný úsek PCR produktu má délku 177 bází. Na Obrázku 30 je vidět pík zaznamenaný použitým softwarem s počtem bází 175. Ten odpovídá amplifikovanému úseku p53β. Těsně před ním je vidět pík se softwarem vypočtenou délkou 160 pb, který by mohl odpovídat hledanému p53βΔ16. Na Obrázku 31 je vidět naštěpený PCR produkt p53β jako dva píky: pík se 126 pb a pík s 53 pb. To dohromady dává 179 pb a odpovídá to neštěpenému produktu z Obrázku 30. Pík se 160 pb na Obrázku 31 zůstal neštěpený a neobsahuje tedy restrikční místo pro SspI-HF™. Tím je potvrzena existence kratší varianty p53β - p53βΔ16.

Pro více informací o této nové transkripční variantě genu *TP53* by bylo potřeba provést další molekulárně-biologické analýzy. Delece 16 nukleotidů není příliš rozsáhlá, ale i přesto může vést ke změně některých vlastností oproti p53β. Inzerce 133 nukleotidů intronu 9 u p53β vede k posunu čtecího rámce a vzniká předčasný stop kodon. To znamená, že protein končí ještě před 16 nukleotidy, které jsou u p53βΔ16 deletovány a jejich delece se tedy na proteinové úrovni nijak neprojeví. Přesto mRNA p53β obsahující těchto 16 nukleotidů by mohla mít nějakou regulační úlohu. Je ale také možné, že jde pouze o produkt aberantního sestřihu v nádorových buňkách. Luciferázovým testem by bylo možné zjistit, jak p53βΔ16 ovlivňuje transkripční aktivitu FLp53. Zajímavé by také bylo zkoumat jeho buněčnou lokalizaci, zjistit jeho vliv na replikační stárnutí, buněčnou proliferaci a na další děje. Také by bylo vhodné navrhnout specifickou PCR v reálném čase a pomocí ní studovat expresi p53βΔ16 ve zdravých tkáních za fyziologických podmínek a také v dalších typech nádorových buněk.

6 ZÁVĚR

Abnormality v genu *TP53* jsou vážným problémem pacientů postižených rakovinou. Obzvláště závažná, přestože zdaleka ne nejčastější, je přítomnost mutací a/nebo delecí *TP53* v buňkách hematopoetického systému. Ty totiž vedou k rezistenci na chemoterapii, rychlé progresi a špatné prognóze.

V rámci předkládané diplomové práce byla optimalizována PCR, která byla určena pro amplifikaci izoformy p53β. Tato PCR je specifická v tom, že díky vhodnému navržení primerů dochází k amplifikaci pouze několika nukleotidů, které obsahuje jenom právě p53β.

Dále bylo touto PCR stanoveno nejmenší množství DNA, které je po proběhlé reakci ještě detekovatelné na 1,5% agarózovém gelu. Jako minimální množství bylo stanoveno $1 \cdot 10^6$ molekul.

Specifická PCR byla dále použita také pro screening p53β. Byla zjištěna čestnost jejího výskytu v B-lymfocytech pacientů s chronickou lymfocytární leukémií, tedy v nedělících se buňkách zastavených v G0 fázi. Již v dřívějších studiích byla tato izoforma v nedělících se buňkách popsána a výsledky uvedené v této diplomové práci to potvrzují. Dále byla zjišťována přítomnost p53β v různých typech buněčných linií, tedy rychle se dělících buňkách. Pro rychle se dělící buňky totiž zatím mnoho studií provedeno nebylo. Stejně jako u CLL B-lymfocytů, i v buněčných liniích se izoforma p53β vyskytovala ve všech analyzovaných vzorcích. Přestože kvalitativní výsledek byl pro všechny vzorky (CLL B-lymfocyty i buněčné linie) stejný, kvantitativním stanovením by byla pravděpodobně zjištěna v jednotlivých vzorcích různá míra exprese proteinu p53β.

Během dřívějších analýz prováděných v CMBGT byla zachycena přítomnost izoformy p53β, která postrádala 16 nukleotidů. Dosud ale v literatuře žádná taková izoforma popsána nebyla. Proto bylo dalším cílem této práce provést detekci této kratší izoformy pomocí restriční štěpení a analýzy pomocí Bioanalyzeru. Porovnáním výstupů z Bioanalyzeru pro štěpené a neštěpené vzorky byla potvrzena existence kratší izoformy p53β, která byla nazvána p53βΔ16. Dalšími metodami je možné zjistit její lokalizaci a účinky.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1]. SOUSSI, T, C CARON DE FROMENTEL a P MAY. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*. 1990, roč. 5, č. 7, s. 945–952. ISSN 0950-9232.
- [2]. SOUSSI, T a P MAY. Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution: A Second Look. *Journal of Molecular Biology*. 1996, roč. 260, č. 5, s. 623–637. ISSN 00222836. doi 10.1006/jmbi.1996.0425.
- [3]. BATES, S a K H VOUSDEN. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 1999, roč. 55, č. 1, s. 28–37. ISSN 1420-682X.
- [4]. CHEN, Y, R DEY a L CHEN. Crystal Structure of the p53 Core Domain Bound to a Full Consensus Site as a Self-Assembled Tetramer. *Structure*. 2010, roč. 18, č. 2, s. 246–256. ISSN 09692126. doi 10.1016/j.str.2009.11.011.
- [5]. LANE, D P a L V CRAWFORD. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979, roč. 278, č. 5701, s. 261–263. ISSN 0028-0836.
- [6]. HUPP, T R, D P LANE a K L BALL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *The Biochemical journal*. 2000, roč. 352 Pt 1, s. 1–17. ISSN 0264-6021.
- [7]. SOUSSI, T a C BÉROUD. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*. 2001, roč. 1, č. 3, s. 233–239. ISSN 14741768. doi 10.1038/35106009.
- [8]. CHÈNE, P. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*. 2001, roč. 20, č. 21, s. 2611–2617. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1204373.
- [9]. CHEN, J, V MARECHAL a A J LEVINE. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Molecular and cellular biology*. 1993, roč. 13, č. 7, s. 4107–4114. ISSN 0270-7306.
- [10]. RAYCROFT, L, H. WU a G LOZANO. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science*. 1990, roč. 249, č. 4972, s. 1049–1051. ISSN 0036-8075, 1095-9203. doi 10.1126/science.2144364.
- [11]. SAKAMURO, D, P SABBATINI, E WHITE a G C PRENDERGAST. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*. 1997, roč. 15, č. 8, s. 887–898. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1201263.
- [12]. ZHU, J, J JIANG, W ZHOU, K ZHU a X CHEN. Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene*. 1999, roč. 18, č. 12, s. 2149–2155. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1202533.
- [13]. BERGAMASCHI, D, Y SAMUELS, A SULLIVAN, M ZVELEBIL, H BREYSSSENS, A BISSO, G DEL SAL, N SYED, P SMITH, M GASCO, T CROOK a X LU. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon

72-polymorphic p53. *Nature Genetics*. 2006, roč. 38, č. 10, s. 1133–1141. ISSN 1061-4036. doi 10.1038/ng1879.

[14]. EL-DEIRY, W S, S E KERN, J A PIETENPOL, K W KINZLER a B VOGELSTEIN. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*. 1992, roč. 1, č. 1, s. 45–49. ISSN 1061-4036. doi 10.1038/ng0492-45.

[15]. BARONI, T E, T WANG, H QIAN, L R DEARTH, L N TRUONG, J ZENG, A E DENES, S W CHEN a R K BRACHMANN. A global suppressor motif for p53 cancer mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, roč. 101, č. 14, s. 4930–4935. ISSN 0027-8424. doi 10.1073/pnas.0401162101.

[16]. BRAZDOVA, M, J PALEČEK, D I CHERNY, S BILLOVÁ, M FOJTA, P PEČINKA, B VOJTĚŠEK, T M JOVIN a E PALEČEK. Role of tumor suppressor p53 domains in selective binding to supercoiled DNA. *Nucleic Acids Research*. 2002, roč. 30, č. 22, s. 4966–4974. ISSN 13624962. doi 10.1093/nar/gkf616.

[17]. HAINAUT, P, T HERNANDEZ, A ROBINSON, P RODRIGUEZ-TOME, T FLORES, M HOLLSTEIN, C C HARRIS a R MONTESANO. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic acids research*. 1998, roč. 26, č. 1, s. 205–213. ISSN 0305-1048.

[18]. WEINBERG, R L, S M V FREUND, D B VEPRINTSEV, M BYCROFT a A R FERSHT. Regulation of DNA Binding of p53 by its C-terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*. 2004, roč. 342, č. 3, s. 801–811. ISSN 00222836. doi 10.1016/j.jmb.2004.07.042.

[19]. DAVISON, T S, P YIN, E NIE, C KAY a C H ARROWSMITH. Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene*. 1998, roč. 17, č. 5, s. 651–656. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1202062.

[20]. LOMAX, M E, D M BARNES, T R HUPP, S M PICKSLEY a R S CAMPLEJOHN. Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members. *Oncogene*. 1998, roč. 17, č. 5, s. 643–649. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1201974.

[21]. JORDAN, J J, D MENENDEZ, A INGA, M NOURREDINE, D BELL a M A RESNICK. Noncanonical DNA Motifs as Transactivation Targets by Wild Type and Mutant p53. *PLoS Genetics*. 2008, roč. 4, č. 6, s. e1000104. ISSN 1553-7404. doi 10.1371/journal.pgen.1000104.

[22]. STRANO, S, M ROSSI, G FONTEMAGGI, E MUNARRIZ, S SODDU, A SACCHI a G BLANDINO. From p63 to p53 across p73. *FEBS letters*. 2001, roč. 490, č. 3, s. 163–170. ISSN 0014-5793.

[23]. TAKAOKA, A, S HAYAKAWA, H YANAI, D STOIBER, H NEGISHI, H KIKUCHI, S SASAKI, K IMAI, T SHIBUE, K HONDA a T TANIGUCHI. Integration of

interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003, roč. 424, č. 6948, s. 516–523. ISSN 1476-4687. doi 10.1038/nature01850.

[24]. MAZAN-MAMCZARZ, K, S GALBÁN, I LÓPEZ DE SILANES, J L MARTINDALE, U ATASOY, J D KEENE a M GOROSPE. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, roč. 100, č. 14, s. 8354–8359. ISSN 0027-8424. doi 10.1073/pnas.1432104100.

[25]. FU, L a S BENCHIMOL. Participation of the human p53 3'UTR in translational repression and activation following γ -irradiation. *The EMBO Journal*. 1997, roč. 16, č. 13, s. 4117–4125. ISSN 0261-4189, 1460-2075. doi 10.1093/emboj/16.13.4117.

[26]. APPELLA, E a C W ANDERSON. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001, roč. 268, č. 10, s. 2764–2772. ISSN 0014-2956.

[27]. GU, B a W D ZHU. Surf the Post-translational Modification Network of p53 Regulation. *International Journal of Biological Sciences*. 2012, s. 672–684. ISSN 1449-2288. doi 10.7150/ijbs.4283.

[28]. BODE, A M a Z DONG. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2004, roč. 4, č. 10, s. 793–805. ISSN 1474-175X, 1474-1768. doi 10.1038/nrc1455.

[29]. ASHCROFT, M a K H VOUSDEN. Regulation of p53 stability. *Oncogene*. 1999, roč. 18, č. 53, s. 7637–7643. ISSN 09509232. doi 10.1038/sj.onc.1203012.

[30]. MOMAND, J, G P ZAMBETTI, D C OLSON, D GEORGE a A J LEVINE. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992, roč. 69, č. 7, s. 1237–1245. ISSN 0092-8674.

[31]. BÖTTGER, V, A BÖTTGER, C GARCIA-ECHEVERRIA, Y F RAMOS, A J VAN DER EB, A G JOCHEMSEN a D P LANE. Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene*. 1999, roč. 18, č. 1, s. 189–199. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1202281.

[32]. MARINE, J C a A G JOCHEMSEN. Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005, roč. 331, č. 3, s. 750–760. ISSN 0006291X. doi 10.1016/j.bbrc.2005.03.151.

[33]. OVERHOLTZER, M, P RAO, R FAVIS, X LU, M B ELOWITZ, F BARANY, M LADANYI, R GORLICK a A J LEVINE. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, roč. 100, č. 20, s. 11547–11552. ISSN 0027-8424. doi 10.1073/pnas.1934852100.

[34]. LJUNGMAN, M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2000, roč. 2, č. 3, s. 208–225. ISSN 1522-8002.

[35]. CANMAN, C E, D S LIM, K A CIMPRICH, Y TAYA, K TAMAI, K SAKAGUCHI, E APPELLA, M B KASTAN a J D SILICIANO. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science (New York, N.Y.)*. 1998, roč. 281, č. 5383, s. 1677–1679. ISSN 0036-8075.

[36]. RONEN, D, D SCHWARTZ, Y TEITZ, N GOLDFINGER a V ROTTER. Induction of HL-60 cells to undergo apoptosis is determined by high levels of wild-type p53 protein whereas differentiation of the cells is mediated by lower p53 levels. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1996, roč. 7, č. 1, s. 21–30. ISSN 1044-9523.

[37]. TAYLOR, W R a G R STARK. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001, roč. 20, č. 15, s. 1803–1815. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1204252.

[38]. LEVINE, A J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997, roč. 88, č. 3, s. 323–331. ISSN 0092-8674.

[39]. LEVINE, A J, C A FINLAY a P W HINDS. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*. 2004, roč. 116, č. 2 Suppl, s. S67–69, 1 p following S69. ISSN 0092-8674.

[40]. SHIVAKUMAR, C V, D R BROWN, S DEB a S P DEB. Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Molecular and cellular biology*. 1995, roč. 15, č. 12, s. 6785–6793. ISSN 0270-7306.

[41]. TAKAGAKI, N, Y SOWA, T OKI, R NAKANISHI, S YOGOSAWA a T SAKAI. Apigenin induces cell cycle arrest and p21/WAF1 expression in a p53-independent pathway. *International journal of oncology*. 2005, roč. 26, č. 1, s. 185–189. ISSN 1019-6439.

[42]. MORGAN, S E a M B KASTAN. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Advances in cancer research*. 1997, roč. 71, s. 1–25. ISSN 0065-230X.

[43]. HARPER, J W, S J ELLEDGE, K KEYOMARSI, B DYNLACHT, L H TSAI, P ZHANG, S DOBROWOLSKI, C BAI, L CONNELL-CROWLEY a E SWINDELL. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Molecular biology of the cell*. 1995, roč. 6, č. 4, s. 387–400. ISSN 1059-1524.

[44]. EZHEVSKY, S A, A HO, M BECKER-HAPAK, P K DAVIS a S F DOWDY. Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Molecular and cellular biology*. 2001, roč. 21, č. 14, s. 4773–4784. ISSN 0270-7306. doi 10.1128/MCB.21.14.4773-4784.2001.

[45]. JU, Z D, A R CHOUDHURY a K L RUDOLPH. A Dual Role of p21 in Stem Cell Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007, roč. 1100, č. 1, s. 333–344. ISSN 0077-8923. doi 10.1196/annals.1395.036.

[46]. GARTEL, A a A L TYNER. Transcriptional Regulation of the p21(WAF1/CIP1)Gene. *Experimental Cell Research*. 1999, roč. 246, č. 2, s. 280–289. ISSN 00144827. doi 10.1006/excr.1998.4319.

[47]. LIEN, H, H LIN, Y WANG, L CHEN, D YANG, Y LAI a Y HO. Inhibition of Anchorage-Independent Proliferation and G0/G1 Cell-Cycle Regulation in Human Colorectal Carcinoma Cells by 4,7-Dimethoxy-5-Methyl-1,3-Benzodioxole Isolated from the Fruiting Body of Antrodia camphorate. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, roč. 2011, s. 1–10. ISSN 1741-427X, 1741-4288. doi 10.1093/ecam/nep020.

[48]. ZHAN, Q, S FAN, I BAE, C GUILLOUF, D A LIEBERMANN, P M O'CONNOR a A J FORNACE Jr. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*. 1994, roč. 9, č. 12, s. 3743–3751. ISSN 0950-9232.

[49]. SNUSTAD, D P, M J SIMMONS, A MATALOVÁ a J G MENDEL. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 9788021048522 8021048522.

[50]. YU, J, Z WANG, K W KINZLER, B VOGELSTEIN a L ZHANG. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, roč. 100, č. 4, s. 1931–1936. ISSN 0027-8424. doi 10.1073/pnas.2627984100.

[51]. AMARAL, J D, J M XAVIER, C J STEER a C M RODRIGUES. The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*. 2010, roč. 9, č. 45, s. 145–152. ISSN 1944-7930.

[52]. TEODORO, J G, S K EVANS a M R GREEN. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2007, roč. 85, č. 11, s. 1175–1186. ISSN 0946-2716. doi 10.1007/s00109-007-0221-2.

[53]. WARBUG, O. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*. 1956, roč. 123, č. 3191, s. 309–314. ISSN 0036-8075.

[54]. ZHIVOTOVSKY, B a S ORRENIUS. The Warburg Effect returns to the cancer stage. *Seminars in Cancer Biology*. 2009, roč. 19, č. 1, s. 1–3. ISSN 1044579X. doi 10.1016/j.semcancer.2008.12.003.

[55]. PUZIO-KUTER, A M. The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes & Cancer*. 2011, roč. 2, č. 4, s. 385–391. ISSN 1947-6019, 1947-6027. doi 10.1177/1947601911409738.

[56]. ALARCÓN, R, C KOUMENIS, R K GEYER, C G MAKI a A J GIACCIA. Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer research*. 1999, roč. 59, č. 24, s. 6046–6051. ISSN 0008-5472.

[57]. OKOROKOV, A L a J MILNER. An ATP/ADP-dependent molecular switch regulates the stability of p53-DNA complexes. *Molecular and cellular biology*. 1999, roč. 19, č. 11, s. 7501–7510. ISSN 0270-7306.

[58]. LINDSTRÖM, M S, C DEISENROTH a Y ZHANG. Putting a finger on growth surveillance: insight into MDM2 zinc finger-ribosomal protein interactions. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 2007, roč. 6, č. 4, s. 434–437. ISSN 1551-4005.

[59]. SCHWARTZENBERG-BAR-YOSEPH, Fabiana, M ARMONI a E KARNIELI. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer research*. 2004, roč. 64, č. 7, s. 2627–2633. ISSN 0008-5472.

[60]. KONDOH, H, M E LLEONART, J GIL, J WANG, P DEGAN, G PETERS, D MARTINEZ, A CARNERO a D BEACH. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer research*. 2005, roč. 65, č. 1, s. 177–185. ISSN 0008-5472.

[61]. BENSAAD, K, A TSURUTA, M A SELAK, M N C VIDAL, K NAKANO, R BARTRONS, E GOTTLIEB a K H VOUSDEN. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 2006, roč. 126, č. 1, s. 107–120. ISSN 0092-8674. doi 10.1016/j.cell.2006.05.036.

[62]. KAWAUCHI, K, K ARAKI, K TOBIUME a N TANAKA. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF- κ B pathway and inhibits cell transformation. *Nature Cell Biology*. 2008, roč. 10, č. 5, s. 611–618. ISSN 1465-7392, 1476-4679. doi 10.1038/ncb1724.

[63]. RUIZ-LOZANO, P, M L HIXON, M W WAGNER, A I FLORES, S IKAWA, A S BALDWIN Jr, K R CHIEN a A GUALBERTO. p53 is a transcriptional activator of the muscle-specific phosphoglycerate mutase gene and contributes in vivo to the control of its cardiac expression. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1999, roč. 10, č. 5, s. 295–306. ISSN 1044-9523.

[64]. JOHNSON, R F a N D PERKINS. Nuclear factor- κ B, p53, and mitochondria: regulation of cellular metabolism and the Warburg effect. *Trends in Biochemical Sciences*. 2012, roč. 37, č. 8, s. 317–324. ISSN 09680004. doi 10.1016/j.tibs.2012.04.002.

[65]. MURRAY-ZMIJEWSKI, F, D P LANE a J-C BOURDON. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell death and differentiation*. 2006, roč. 13, č. 6, s. 962–972. ISSN 1350-9047. doi 10.1038/sj.cdd.4401914.

[66]. KAGHAD, M, H BONNET, A YANG, L CREANCIER, J C BISCAN, A VALENT, A MINTY, P CHALON, J M LELIAS, X DUMONT, P FERRARA, F MCKEON a D CAPUT. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997, roč. 90, č. 4, s. 809–819. ISSN 0092-8674.

[67]. YANG, A, M KAGHAD, Y WANG, E GILLET, M D FLEMING, V DÖTSCH, N C ANDREWS, D CAPUT a F MCKEON. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular cell*. 1998, roč. 2, č. 3, s. 305–316. ISSN 1097-2765.

[68]. BOURDON, J-C. p53 and its isoforms in cancer. *British Journal of Cancer*. 2007, roč. 97, č. 3, s. 277–282. ISSN 0007-0920, 1532-1827. doi 10.1038/sj.bjc.6603886.

[69]. ARROWSMITH, C H. Structure and function in the p53 family. *Cell death and differentiation*. 1999, roč. 6, č. 12, s. 1169–1173. ISSN 1350-9047. doi 10.1038/sj.cdd.4400619.

[70]. MOLL, U M a N SLADE. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Molecular cancer research: MCR*. 2004, roč. 2, č. 7, s. 371–386. ISSN 1541-7786.

[71]. LEVINE, A J, R TOMASINI, F D MCKEON, T W MAK a G MELINO. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011, roč. 12, č. 4, s. 259–265. ISSN 1471-0072, 1471-0080. doi 10.1038/nrm3086.

[72]. WESTFALL, M D, A S JOYNER, C E BARBIERI, M LIVINGSTONE a J A PIETENPOL. Ultraviolet Radiation Induces Phosphorylation and Ubiquitin-Mediated Degradation of Δ NP63 α . *Cell Cycle*. 2005, roč. 4, č. 5, s. 710–716. ISSN 1538-4101. doi 10.4161/cc.4.5.1685.

[73]. FILLIPPOVICH, I, N SOROKINA, M GATEI, Y HAUPT, K HOBSON, E MOALLEM, K SPRING, M MOULD, M A MCGUCKIN, M F LAVIN a K K KHANNA. Transactivation-deficient p73 α (p73 Δ exon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene*. 2001, roč. 20, č. 4, s. 514–522. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1204118.

[74]. FANG, M, I SIMEONOVA a F TOLEDO. p53: Point Mutations, SNPs and Cancer. In: C LOGIE, ed. *Point Mutation* [online]. S.l.: InTech, 2012. [vid. 21. duben 2013]. ISBN 978-953-51-0331-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/point-mutation/p53-point-mutations-snps-and-cancer>.

[75]. BERNARD, H, B GARMY-SUSINI, N AINAOU, L VAN DEN BERGHE, A PEURICHARD, S JAVERZAT, A BIKFALVI, D P LANE, J C BOURDON a A C PRATS. The p53 isoform, Δ 133p53 α , stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene*. 2012, ISSN 1476-5594. doi 10.1038/onc.2012.242.

[76]. GHOSH, A, D STEWART a G MATLASHEWSKI. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Molecular and cellular biology*. 2004, roč. 24, č. 18, s. 7987–7997. ISSN 0270-7306. doi 10.1128/MCB.24.18.7987-7997.2004.

[77]. SHARATHCHANDRA, A, R LAL, D KHAN a S DAS. Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biology*. 2012, roč. 9, č. 12, s. 1429–1439. ISSN 1547-6286. doi 10.4161/rna.22707.

[78]. LEVINE, A J a M OREN. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer*. 2009, roč. 9, č. 10, s. 749–758. ISSN 1474-1768. doi 10.1038/nrc2723.

[79]. MARCEL, V, S PERRIER, M AOUBALA, S AGEORGES, M J GROVES, A DIOT, K FERNANDES, S TAURO a J C BOURDON. Δ 160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Δ 133p53 transcript. *FEBS Letters*. 2010, roč. 584, č. 21, s. 4463–4468. ISSN 00145793. doi 10.1016/j.febslet.2010.10.005.

[80]. ADAM, M P a J C BOURDON. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes & cancer*. 2011, roč. 2, č. 4, s. 453–465. ISSN 1947-6027. doi 10.1177/1947601911408893.

[81]. KHOURY, M P a J C BOURDON. The Isoforms of the p53 Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009, roč. 2, č. 3, s. a000927–a000927. ISSN 1943-0264. doi 10.1101/cshperspect.a000927.

[82]. BOURDON, J C. p53 Family isoforms. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2007, roč. 8, č. 6, s. 332–336. ISSN 1873-4316.

[83]. BOURDON, J C, K FERNANDES, F MURRAY-ZMIJEWSKI, G LIU, A DIOT, D P XIRODIMAS, M K SAVILLE a D P LANE. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. 2005, roč. 19, č. 18, s. 2122–2137. ISSN 0890-9369. doi 10.1101/gad.1339905.

[84]. FUJITA, K, A M MONDAL, I HORIKAWA, G H NGUYEN, K KUMAMOTO, J J SOHN, E D BOWMAN, E A MATHE, A J SCHETTER, S R PINE, H JI, B VOJTESEK, J C BOURDON, D P LANE a C C HARRIS. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature cell biology*. 2009, roč. 11, č. 9, s. 1135–1142. ISSN 1476-4679. doi 10.1038/ncb1928.

[85]. COURTOIS, S, G VERHAEGH, S NORTH, M G LUCIANI, P LASSUS, U HIBNER, M OREN a P HAINAUT. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. 2002, roč. 21, č. 44, s. 6722–6728. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1205874.

[86]. POWELL, D J, R HRSTKA, M CANDEIAS, K BOUROUGAA, B VOJTESEK a R FÅHRAEUS. Stress-dependent changes in the properties of p53 complexes by the alternative translation product p53/47. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 2008, roč. 7, č. 7, s. 950–959. ISSN 1551-4005.

[87]. GROVER, R, M M CANDEIAS, R FÅHRAEUS a S DAS. p53 and little brother p53/47: linking IRES activities with protein functions. *Oncogene*. 2009, roč. 28, č. 30, s. 2766–2772. ISSN 0950-9232, 1476-5594. doi 10.1038/onc.2009.138.

[88]. WALKER, K K a A J LEVINE. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, roč. 93, č. 26, s. 15335–15340. ISSN 0027-8424.

[89]. BAPTISTE, N, P FRIEDLANDER, X CHEN a C PRIVES. The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene*. 2002, roč. 21, č. 1, s. 9–21. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1205015.

[90]. HILL, A J, H TERAOKA, W HEIDEMAN a R E PETERSON. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of*

the Society of Toxicology. 2005, roč. 86, č. 1, s. 6–19. ISSN 1096-6080. doi 10.1093/toxsci/kfi110.

[91]. ZAPATA, A, B DIEZ, T CEJALVO, C GUTIÉRREZ-DE FRÍAS a A CORTÉS. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & shellfish immunology*. 2006, roč. 20, č. 2, s. 126–136. ISSN 1050-4648. doi 10.1016/j.fsi.2004.09.005.

[92]. NAGEL, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*. 2002, roč. 19 Suppl 1, s. 38–48. ISSN 1868-596X.

[93]. AOUBALA, M, F MURRAY-ZMIJEWSKI, M P KHOURY, K FERNANDES, S PERRIER, H BERNARD, A-C PRATS, D P LANE a J-C BOURDON. p53 directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death and Differentiation*. 2010, roč. 18, č. 2, s. 248–258. ISSN 1350-9047, 1476-5403. doi 10.1038/cdd.2010.91.

[94]. ANENSEN, N, A M OYAN, J C BOURDON, K H KALLAND, O BRUSERUD a B T GJERTSEN. A distinct p53 protein isoform signature reflects the onset of induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006, roč. 12, č. 13, s. 3985–3992. ISSN 1078-0432. doi 10.1158/1078-0432.CCR-05-1970.

[95]. BOLDRUP, L, J C BOURDON, P J COATES, B SJÖSTRÖM a K NYLANDER. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*. 2007, roč. 43, č. 3, s. 617–623. ISSN 0959-8049. doi 10.1016/j.ejca.2006.10.019.

[96]. AVERY-KIEJDA, K A, X D ZHANG, L J ADAMS, R J SCOTT, B VOJTESEK, D P LANE a P HERSEY. Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008, roč. 14, č. 6, s. 1659–1668. ISSN 1078-0432. doi 10.1158/1078-0432.CCR-07-1422.

[97]. MARABESE, M, S MARCHINI, E MARRAZZO, P MARIANI, D CATTANEO, R FOSSATI, A COMPAGNONI, M SIGNORELLI, U M MOLL, A M CODEGONI a M BROGGINI. Expression levels of p53 and p73 isoforms in stage I and stage III ovarian cancer. *European Journal of Cancer*. 2008, roč. 44, č. 1, s. 131–141. ISSN 09598049. doi 10.1016/j.ejca.2007.10.011.

[98]. SONG, W, S HUO, J LÜ, Z LIU, X FANG, X JIN a M YUAN. Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. *Chinese medical journal*. 2009, roč. 122, č. 8, s. 921–926. ISSN 0366-6999.

[99]. COLLOT-TEIXEIRA, S, J C BISCAN, F DENIS a S RANGER-ROGEZ. Human tumor suppressor p53 and DNA viruses. *Reviews in Medical Virology*. 2004, roč. 14, č. 5, s. 301–319. ISSN 1052-9276, 1099-1654. doi 10.1002/rmv.431.

[100]. PETITJEAN, A, E MATHE, S KATO, C ISHIOKA, S V TAVTIGIAN, P HAINAUT a M OLIVIER. 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, roč. 28, č. 6, s. 622–629. ISSN 1098-1004. doi 10.1002/humu.20495.

[101]. FLOQUET, C, J DEFORGES, J ROUSSET a L BIDOU. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic acids research*. 2011, roč. 39, č. 8, s. 3350–3362. ISSN 1362-4962. doi 10.1093/nar/gkq1277.

[102]. LU, X a A FEKI. Phenotypic features with p53 alterations related to human papillomavirus and prognostic evaluation in cervical cancer. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2006, roč. 16, č. 2, s. 708–717. ISSN 1048-891X. doi 10.1111/j.1525-1438.2006.00591.x.

[103]. HAINAUT, P a M HOLLSTEIN. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research*. 2000, roč. 77, s. 81–137. ISSN 0065-230X.

[104]. JOERGER, A C, H C ANG, D B VEPRINTSEV, C M BLAIR a A R FERSHT. Structures of p53 cancer mutants and mechanism of rescue by second-site suppressor mutations. *The Journal of biological chemistry*. 2005, roč. 280, č. 16, s. 16030–16037. ISSN 0021-9258. doi 10.1074/jbc.M500179200.

[105]. SHIRAISHI, K, S KATO, S HAN, W LIU, K OTSUKA, M SAKAYORI, T ISHIDA, M TAKEDA, R KANAMARU, N OHUCHI a C ISHIOKA. Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library. *The Journal of biological chemistry*. 2004, roč. 279, č. 1, s. 348–355. ISSN 0021-9258. doi 10.1074/jbc.M310815200.

[106]. BULLOCK, A N, J HENCKEL a A R FERSHT. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*. 2000, roč. 19, č. 10, s. 1245–1256. ISSN 09509232. doi 10.1038/sj.onc.1203434.

[107]. DE VRIES, A, E R FLORES, B MIRANDA, H HSIEH, C VAN OOSTROM, J SAGE a T JACKS. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, roč. 99, č. 5, s. 2948–2953. ISSN 0027-8424. doi 10.1073/pnas.052713099.

[108]. SIGAL, A a V ROTTER. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer research*. 2000, roč. 60, č. 24, s. 6788–6793. ISSN 0008-5472.

[109]. OSTERMEYER, A G, E RUNKO, B WINKFIELD, B AHN a U M MOLL. Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996, roč. 93, č. 26, s. 15190–15194. ISSN 0027-8424.

[110]. MALCIKOVA, J. *Studium aktivity proteinu p53 u leukémií*. 2009. S.l.: s.n. Dizertační práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Vedoucí dizertační práce Prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

[111]. SCHNEIDER, K, K ZELLEY, K E NICHOLS a J GARBER. Li-Fraumeni Syndrome. In: R A PAGON, T D BIRD, C R DOLAN, K STEPHENS a M P ADAM, ed. *GeneReviewsTM* [online]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993. [vid. 21. duben 2013]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1311/>.

[112]. *The metabolic & molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. ISBN 0079130356.

[113]. RUIJS, M W, A BROEKS, F H MENKO, M AUSEMS, A WAGNER, R OLDENBURG, H MEIJERS-HEIJBOER, L J VAN'T VEER a S VERHOEF. The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 2009, roč. 7, č. 1, s. 4. ISSN 1897-4287. doi 10.1186/1897-4287-7-4.

[114]. EICHHORST, B, M DREYLING, T ROBAK, E MONTSERRAT, M HALLEK a ON BEHALF OF THE ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2011, roč. 22, č. Supplement 6, s. vi50–vi54. ISSN 0923-7534, 1569-8041. doi 10.1093/annonc/mdr377.

[115]. HALLEK, M, B D CHESON, D CATOVSKY, F CALIGARIS-CAPPIO, G DIGHIERO, H DOHNER, P HILLMEN, M J KEATING, E MONTSERRAT, K R RAI a T J KIPPS. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008, roč. 111, č. 12, s. 5446–5456. ISSN 0006-4971, 1528-0020. doi 10.1182/blood-2007-06-093906.

[116]. DEAGLIO, S a F MALAVASI. Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation. *Haematologica*. 2009, roč. 94, č. 6, s. 752–756. ISSN 0390-6078, 1592-8721. doi 10.3324/haematol.2009.006676.

[117]. STILGENBAUER, S, P LICHTER a H DOHNER. Genetic Features of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*. 2000, roč. 4, č. 1, s. 48–72. ISSN 1127-0020, 1468-0734. doi 10.1046/j.1468-0734.2000.00003.x.

[118]. BINET, J. L., M. LEPOPRIER, G. DIGHIERO, D CHARRON, P D'ATHIS, G VAUGIER, H M BERAL, J C BOURDON, M RAPHAEL, B NIZET a J Y FOLLEZOU. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977, roč. 40, č. 2, s. 855–864. ISSN 0008-543X.

[119]. DAMLE, R N, T WASIL, F FAIS, F GHIOTTO, A VALETTO, S L ALLEN, A BUCHBINDER, D BUDMAN, K DITTMAR, J KOLITZ, S M LICHTMAN, P SCHULMAN, V P VINCIGUERRA, K R RAI, M FERRARINI a N CHIORAZZI. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999, roč. 94, č. 6, s. 1840–1847. ISSN 0006-4971.

[120]. HUS, I. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Oncology*. 2006, roč. 17, č. 4, s. 683–690. ISSN 0923-7534, 1569-8041. doi 10.1093/annonc/mdj120.

[121]. PARKER, T L a M P STROUT. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic factors and impact on treatment. *Discovery medicine*. 2011, roč. 11, č. 57, s. 115–123. ISSN 1944-7930.

[122]. RAI, K R, A SAWITSKY, E P CRONKITE, A D CHANANA, R N LEVY a B S PASTERNAK. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975, roč. 46, č. 2, s. 219–234. ISSN 0006-4971.

[123]. SHEN, Q, W XU, H YU, L LI, S ZHANG a J LI. [Prognostic significance of lactate dehydrogenase and beta2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology*. 2007, roč. 15, č. 6, s. 1305–1308. ISSN 1009-2137.

[124]. BINET, J L, A AUQUIER, G DIGHIERO, C CHASTANG, H PIGUET, J GOASGUEN, G VAUGIER, G POTRON, P COLONA, F OBERLING, M THOMAS, G TCHERNIA, C JACQUILLAT, P BOIVIN, C LESTY, M T DUAULT, M MONCONDUIT, S BELABBES a F GREMY. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981, roč. 48, č. 1, s. 198–206. ISSN 0008-543X.

[125]. DÖHNER, H, S STILGENBAUER, A BENNER, E LEUPOLT, A KRÖBER, L BULLINGER, K DÖHNER, M BENTZ a P LICHTER. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000, roč. 343, č. 26, s. 1910–1916. ISSN 0028-4793. doi 10.1056/NEJM200012283432602.

[126]. DAL BO, M, F M ROSSI, D ROSSI, C DEAMBROGI, F BERTONI, I DEL GIUDICE, G PALUMBO, M NANNI, A RINALDI, I KWEE, E TISSINO, G CORRADINI, A GOZZETTI, E CENCINI, M LADETTO, A M COLETTA, F LUCIANO, P BULIAN, G POZZATO, L LAURENTI, F BARANY, F DI RAIMONDO, R MARASCA, G DEL POETA, G GAIDANO, R FOÀ, A GUARINI a V GATTEI. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011, roč. 50, č. 8, s. 633–643. ISSN 1098-2264. doi 10.1002/gcc.20885.

[127]. JULIUSSON, G, D G OSCIER, M FITCHETT, F M ROSS, G STOCKDILL, M J MACKIE, A C PARKER, G L CASTOLDI, A GUNEO, S KNUUTILA, E ELONEN a G GAHRTON. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *The New England journal of medicine*. 1990, roč. 323, č. 11, s. 720–724. ISSN 0028-4793. doi 10.1056/NEJM199009133231105.

[128]. MATUTES, E, D OSCIER, J GARCIA-MARCO, J ELLIS, A COPPLESTONE, R GILLINGHAM, T HAMBLIN, D LENS, G J SWANSBURY a D CATOVSKY. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical

and laboratory features in 544 patients. *British Journal of Haematology*. 1996, roč. 92, č. 2, s. 382–388. ISSN 0007-1048, 1365-2141. doi 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1478.x.

[129]. DÖHNER, H, S STILGENBAUER, M R JAMES, A BENNER, T WEILGUNI, M BENTZ, K FISCHER, W HUNSTEIN a P LICHTER. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997, roč. 89, č. 7, s. 2516–2522. ISSN 0006-4971.

[130]. MARINELLI, M, N PERAGINE, V DI MAIO, S CHIARETTI, M S DE PROPRIIS, S RAPONI, S TAVOLARO, F R MAURO, I DEL GIUDICE, A GUARINI a R FOÀ. Identification of molecular and functional patterns of p53 alterations in chronic lymphocytic leukemia patients in different phases of the disease. *Haematologica*. 2013, roč. 98, č. 3, s. 371–375. ISSN 1592-8721. doi 10.3324/haematol.2012.069906.

[131]. POSPISILOVA, S, D GONZALEZ, J MALCIKOVA, M TRBUSEK, D ROSSI, A P KATER, F CYMBALISTA, B EICHHORST, M HALLEK, H DÖHNER, P HILLMEN, M VAN OERS, J GRIBBEN, P GHIA, E MONTSERRAT, S STILGENBAUER a T ZENZ. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012, roč. 26, č. 7, s. 1458–1461. ISSN 1476-5551. doi 10.1038/leu.2012.25.

[132]. DIGHIERO, G, K MALOUM, B DESABLENS, B CAZIN, M NAVARRO, R LEBLAY, M LEPORRIER, J JAUBERT, G LEPEU, B DREYFUS, J L BINET, P TRAVADE, F L TURPIN, G TERTIAN a A BICHOFFÉ. Chlorambucil in Indolent Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1998, roč. 338, č. 21, s. 1506–1514. ISSN 0028-4793, 1533-4406. doi 10.1056/NEJM199805213382104.

[133]. DREGER, P. Allogeneic transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2009, roč. 2009, č. 1, s. 602–609. ISSN 1520-4391, 1520-4383. doi 10.1182/asheducation-2009.1.602.

[134]. PETTITT, A R. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2003, roč. 121, č. 5, s. 692–702. ISSN 0007-1048.

[135]. SMITH, M R. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. 2003, roč. 22, č. 47, s. 7359–7368. ISSN 0950-9232. doi 10.1038/sj.onc.1206939.

[136]. HILLMEN, P, A B SKOTNICKI, T ROBAK, B JAKSIC, A DMOSZYNSKA, J WU, C SIRARD a J MAYER. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007, roč. 25, č. 35, s. 5616–5623. ISSN 1527-7755. doi 10.1200/JCO.2007.12.9098.

[137]. FLAMAN, J-, T FREBOURG, V MOREAU, F CHARBONNIER, C MARTIN, P CHAPPUIS, A P SAPPINO, I M LIMACHER, L BRON a J BENHATTAR. A Simple p53 Functional Assay for Screening Cell Lines, Blood, and Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, roč. 92, č. 9, s. 3963–3967. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi 10.1073/pnas.92.9.3963.

[138]. ŠMARDOVÁ, J, S PAVLOVÁ a H KOUKALOVÁ. Determination of optimal conditions for analysis of p53 status in leukemic cells using functional analysis of separated alleles in yeast. *Pathology oncology research: POR*. 2002, roč. 8, č. 4, s. 245–251. ISSN 1219-4956. doi PAOR.2002.8.4.0245.

[139]. MONTSERRAT, E. New prognostic markers in CLL. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2006, s. 279–284. ISSN 1520-4391. doi 10.1182/asheducation-2006.1.279.

[140]. FLAMAN, J M, F WARIDEL, A ESTREICHER, A VANNIER, J M LIMACHER, D GILBERT, R IGGO a T FREBOURG. The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene*. 1996, roč. 12, č. 4, s. 813–818. ISSN 0950-9232.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A – adenin

AMPK – 5'adenozin monofosfát-aktivovaná proteinkináza (5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase)

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR - Ataxia Teleangiectasia and Rad3 related

Bcl - B-cell lymphoma

BCR – B-buněčný receptor (B-Cell Receptor)

BRCA1 - Gen 1 pro familiární karcinom prsu/vaječníku (Breast Cancer 1)

C – cytosin

CD – diferenční skupina (Cluster of Differentiation)

Cdk - cyklin-dependentní kináza

cDNA – komplementární DNA (complementary DNA)

CLL – chronická lymfocytární leukémie (Chronic lymphocytic leukemia)

CMBGT – Centrum molekulární biologie a genové terapie

CMV - cytomegalovirus

CTD – C-terminální doména (C-Terminal Domain)

DBD – DNA vazebná doména (DNA-Binding Domain)

EBV - virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr Virus)

FASAY - kvasinková funkční analýza separovaných alel (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast)

FCR – fludarabin, cyklofosfamid, rituximab

FL – plná délka (Full Length)

G – guanin

GLUT – glukózový transporter (Glucose Transporter)

HHV – lidský herpes viru (Human Herpes Virus)

iASPP - inhibitory Apoptosis Stimulating Protein of p53

IWCLL-WG - International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia - sponsored Working Group

JNK – jun kináza (Jun Kinase)

L – smyčka (Loop)

LFL - Li-Fraumeni-Like syndrom

LFS - Li-Fraumeni Syndrom

LSH – smyčka-list-helix (Loop-Sheet-Helix)

MDM - Mouse Double Minute

mTOR - mammalian Target Of Rapamycin

NES – jaderný exportní signál (Nuclear Export Signal)

OD, 4D, OLD – tetramerizační doména (Tetramerization Domain)

PCNA - proliferační antigen buněčného jádra (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

PKB - protein kináza B (Protein Kinase B)

PRD – doména bohatá na proliny (Proline Rich Domain)

Pu – purinová báze

Py – pyrimidinová báze

Rb - Retinoblastoma protein

SV 40- Simian Virus 40

T – tymin

TA - Transcription Activation

TAD – transaktivační doména (Transactivation Domain)

TIGAR - *TP53* Induced Glycolysis And Apoptosis Regulator

WT – Wild Type

ZAP 70 - zeta asociovaný protein 70 (Zeta-Associated Protein 70)