

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BOTANIKY



# Regulace aktivity proteinu p53 a p63 v lidské epidermis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Šárka Urbanová  
Vedoucí práce: prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

2011

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu BIO-MEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030

PALACKÝ UNIVERSITY OLOMOUC  
FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BOTANY



# The regulation of p53 and p63 protein activity in human epidermis

THESIS

Author: Bc. Šárka Urbanová  
Supervisor: prof. Jiří Ehrmann M.D., Ph.D.

2011

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu BIO-MEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030

## **ABSTRAKT**

Na epidermis každodenně působí mnoho negativních vlivů, proto je chráněna různými mechanismy. Důležité jsou zejména procesy, které kontrolují buněčný cyklus, zabraňují abnormální proliferaci, přenosu poškozené DNA, podílí se na opravách poškozené DNA a podporují apoptosu. Mezi klíčové regulátory těchto procesů patří cykliny, cyklin-dependentní proteinkinasy (Cdk) a nádorové supresory.

Každá buňka prochází během svého života tzv. buněčným cyklem, který je kontrolován ve dvou bodech, tzv. „check pointech“. Na správné funkci obou „check pointů“ se podílí proteiny rodiny p53 – p53, p63 a p73, díky nimž nedochází k replikaci mutované DNA a k neregulovanému množení poškozených buněk.

Z hlediska negativních vlivů, které na kůži působí, je nejvýznamnějším činitelem ultrafialové záření, jehož účinky jsou genotoxické. Díky slunečním paprskům, které UV záření obsahují, může dojít až k rozvoji zhoubných nádorů kůže.

Z výsledků dosažených v této studii vyplývá, že UVB záření je zjevně škodlivé a že proteiny rodiny p53 jsou k němu různě citlivé. Největší citlivost vykazuje protein p63, jehož isoformy na ozáření UVB reagují odlišně.

Cílem této práce bylo vyhodnotit změny v odebraných explantátech epidermis po ozáření UVB, zhotovit snímky vzorků po imunohistochemické reakci a zpracovat získaná pilotní data.

Dalším úkolem bylo seznámit se se základními postupy imunohistochemie a optimalizovat protokol pro detekci p53, p63 a p73 v ozářené lidské epidermis.

Tato práce se v teoretické části věnuje proteinům p53, p63 a p73, zejména funkci jejich isoform v lidské kůži a vlivu UV záření na lidskou pokožku.

V experimentální části je popsán postup imunohistochemické reakce pro detekci p53 a p63 v ozářené lidské epidermis.

*Klíčová slova:*

*p53, p63, UV záření, imunohistochemie*

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu BIO-MEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030

## **ABSTRACT**

Epidermis is exposed every day to many negative influences that is why it is protected by different mechanisms. The processes of a great importance are these which control cell cycle, prevent abnormal proliferation, prevent transcription of damaged DNA, participate in the repairing damaged DNA and support apoptosis. Cyclin, cyclin-dependent protein kinases and tumor suppressors are the key regulators of these processes.

During its life each cell goes through the cell cycle which is checked in two points - „check points“. Proteins of a p53 family participate in correct function of this check points and prevent transcription of damaged DNA and unregulated proliferation of cells.

One of the most important influences acting on the human skin is an ultraviolet radiation which is genotoxic. Sun rays including the UV radiation can cause a skin cancer.

The UVB radiation is manifestly harmful and the proteins of the p53 family react to the UV radiation in different ways. The most sensitive is p63, its isoforms react variously.

The main goal of the work was to analyse changes in the irradiated explantates, make photos of the samples and to compile the acquired pilot data.

The next goal was to get insight to basic processes of immunohistochemistry and to optimise the protocol of the p53, the p63 and the p73 detection in the irradiated skin.

The theoretic part of the work contains essay about the p53, the p63 and the p73, especially the function of its isoforms in the human skin and the influence of the UV radiation on the human epidermis.

The experimental part describes the process of immunohistochemistry for the p53 and the p63 detection in the irradiated human epidermis.

*Keywords:*

*p53, p63, UV radiation, immunohistochemistry*

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne .....

.....

(podpis)

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu BIO-MEDREG C.1.05/2.1.00/01.0030

#### Poděkování:

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu práce prof. MUDr. Jiřímu Ehrmannovi, Ph.D. za jeho odborné a laskavé vedení, vstřícnost, spolehlivost, iniciativu, trpělivost a obětavost. Velké díky patří také Doc. RNDr. Jitce Vostálové, Ph.D., laborantkám Evě Kašpárkové, a Evě Nezhybové za pomoc nejen při experimentech a MUDr. Daně Kylarové za poskytnuté informace. Největší poděkování si však zaslouží mí rodiče, sestra, příbuzní a přátelé, kteří mě vždy podporovali a stáli za mnou ve všech životních situacích.

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>1 RODINA P53.....</b>	<b>11</b>
1.1 p53 .....	11
1.1.1 Gen p53.....	11
1.1.2 Protein p53.....	12
1.1.3 Regulace p53.....	14
1.1.4 Mutace p53 .....	19
1.1.5 Vazba proteinu p53 se superhelikální DNA .....	20
1.2 p63 .....	22
1.2.1 Gen p63.....	22
1.2.2 Protein p63.....	23
1.2.3 Isoformy p63.....	24
1.2.4 Regulace p63.....	27
1.2.5 Mutace p63 .....	28
1.2.6 Vazba p63 .....	29
1.3 p73 .....	29
1.3.1 Gen p73.....	29
1.3.2 Protein p73.....	30
1.3.3 Isoformy p73.....	31
1.3.4 Regulace p73.....	31
1.3.5 Vazba p73 .....	33
<b>2 LIDSKÁ KŮŽE.....</b>	<b>35</b>
2.1 Epidermis .....	35
2.2 Dermis.....	36
2.3 Rakovina kůže.....	37
<b>3 ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ.....</b>	<b>38</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>41</b>
4.1 Materiál a metodika .....	41
4.1.1 Protilátky.....	41
4.1.2 Pufry.....	41
4.1.3 Chemikálie .....	41

4.1.4	Přístroje .....	42
4.2	Příprava kožních explantátů .....	42
4.3	Ozáření explantátů .....	43
4.4	Imunohistochemie .....	43
4.5	Příprava Bakerova roztoku .....	44
4.6	Příprava citrátového pufru .....	44
4.7	Příprava TRIS pufru .....	45
4.8	Hodnocení .....	45
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>46</b>
5.1	p53 .....	46
5.2	p73 .....	46
5.3	p63 .....	46
	<b>DISKUSE .....</b>	<b>53</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>71</b>



## ÚVOD

Lidská kůže je každodenně vystavena četným negativním vlivům. Proti těmto vlivům je chráněna různými mechanismy, zejména pak procesy, které kontrolují buněčný cyklus tím, že zabraňují abnormální proliferaci, přenosu poškozené DNA do dceřiných buněk, podílí se na opravách poškozené DNA a podporují apoptosu. Tyto procesy jsou regulovány klíčovými proteiny, zejména cykliny, cyklin-dependentními proteinkinasami (Cdk), ale také nádorovými supresory (viz Tab. 1).

Během buněčného cyklu buňky prochází dvěma důležitými kontrolními fázemi, tzv. „check pointy“ a to v G1 a G2 fázi. V těchto místech dochází ke kontrole vhodného prostředí, správné velikosti buňky, celistvosti replikace a poškození DNA.

Mezi klíčové proteiny aktivně se podílející na správné funkci obou „check pointů“ patří rodina proteinů p53.

Od doby, kdy byl protein p53 objeven, je velmi intenzivně zkoumán. Také jeho příbuzní, protein p63 a p73, se těší velkému zájmu. Pokusy se provádějí na myších i na lidské kůži. Ze všech pokusů vyplývá, že rovnováha mezi expresí p53, p63 a p73 a rovnováha mezi různými isoformami TA a  $\Delta N$  pravděpodobně ovlivňuje konečnou signalizaci vedoucí k apoptose či přežití (Watson and Irwin, 2006).

**Tab. 1** - Nejdůležitější nádorové supresory

Název	Lokace	Defekty
p53	chromozom 17	nádory
pRb	chromozom 13	retinoblastom
NF-1	chromozom 17	neurofibromatóza typu 1
NF-2	chromozom 22	neurinom akustiku, gliomy, meningiomy
APC	chromozom 5	familiární adenomatózní polypóza tračníku
WT-1	chromozom 11	Wilmsův nádor ledvin
PTEN	chromozom 10	glioblastomy, melanoblastomy
BRCA 1	chromozom 17	karcinomy mléčné žlázy, ovarií, prostaty, tlustého střeva
BRCA 2	chromozom 13	viz BRCA 1, karcinom pankreatu a hrtanu
p16 <sup>INK4</sup>	chromozom 9	maligní melanom; karcinom pankreatu, jícnu, žaludku; glioblastom

Z hlediska negativních vlivů na kůži je nejdůležitější ultrafialové záření. Jeho účinky jsou genotoxické – působí škodlivě na DNA, ve které způsobuje genové mutace, nebo může způsobit apoptosu (buněčnou smrt). Pokud selžou ochranné mechanismy, může díky slunečním paprskům dojít až k oslabení imunitního systému, očním chorobám a rozvoji zhoubných nádorů kůže. Nejvýznamnější příčinou záření v současnosti je ztenčování ozonové vrstvy, která se nachází ve stratosféře a je nejdůležitější bariérou, která lidskou kůži chrání.

Tato diplomová práce vznikla ve spolupráci s projektem – Molekulární následky akutní a chronické expozice kůže UVA, UVB a slunečnímu záření: Dynamika změn a pronikání mezi UVA a UVB vlnovými délkami (Molecular consequences of acute and subchronic exposure to UVA, UVB and solar radiation in skin: Dynamics of changes and crosstalk between UVA and UVB waveband) – navrženým Ústavem lékařské chemie a biochemie Univerzity Palackého v Olomouci.

Tato diplomová práce je zaměřena spíše na metodiku než na interpretaci výsledků, protože se jedná o pilotní data k tomuto projektu.

# 1 RODINA P53

Rodina p53 savčího genomu obsahuje tři členy, což naznačuje, že proteiny savčí rodiny p53 jsou odvozeny triplikací jednoho původního genu (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Do této skupiny patří tři proteiny: p53, p63 a p73. Každý z těchto proteinů plní důležitou funkci v buněčném cyklu, i při vzniku nádoru a může se vyskytovat v několika isoformách. Jednotlivé isoformy díky odlišné struktuře plní i jinou biologickou funkci.

## 1.1 p53

Protein o relativní molekulové hmotnosti 53 000 (53 kd) neboli p53 byl vyhlášen molekulou roku 1993 (Science 262: 1953, 1958; 1993, 23. prosince). Tento protein je také nazýván „Guardian of Genome“ („Strážce genomu“), chrání před vznikem zhoubného bujení, je přítomen v každé lidské tkáni a záměna jen jedné aminokyseliny v jeho struktuře vede ke vzniku nádoru.

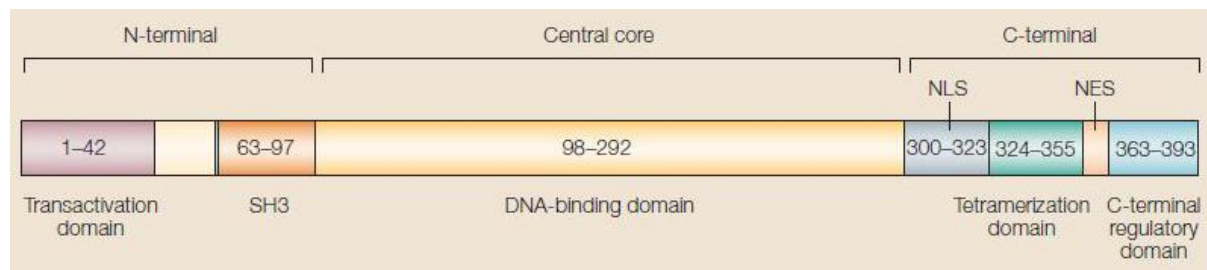
Mezi významné české vědce, kteří se tímto proteinem zabývají, patří Jiří Bártek, Jiřina Bártková a Bořivoj Vojtíšek.

p53 byl objeven roku 1970 profesorem Davidem Lanem (z webové stránky p53-The Guardian of Our Genome), který byl roku 2008 nominován na Nobelovu cenu.

### 1.1.1 Gen p53

Lidský gen p53 se skládá z 19 200 bp, má 11 exonů a nachází se na chromozomu 17p13.1. Transkripce genu p53 může být iniciována dvěma odlišnými stranami - v protisměru exonu 1 a od interního promotoru lokalizovaného na intronu 4. Alternativní promotor vede k expresi proteinu p53, který je zkrácen na konci o některé AMK, zahájené kodonem 133 (D133p53). Intron 9 může být sestřížen třemi způsoby a vzniknou tak tři isoformy p53, p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ , kde isoformy p53 $\beta$  a p53 $\gamma$  postrádají oligomerizační doménu. Lidský gen p53 může kódovat nejméně devět různých p53 proteinových isoform, které se nazývají podle p63/p73 nomenklatury p53, p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ , D133p53, D133p53 $\beta$  a D133p53 $\gamma$  způsobené alternativním sestřihem intronu 9 a užívajícími alternativní promotor v intronu 4 a také D40p53, D40p53 $\beta$ , D40p53 $\gamma$  způsobené alternativním sestřihem intronu 9 a alternativní iniciací translace nebo alternativním sestřihem intronu 2 (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Gen p53 se označuje jako „master gen“, protože protein p53 interaguje s vysokým počtem proteinů a reguluje expresi velkého počtu genů a buněčných procesů.

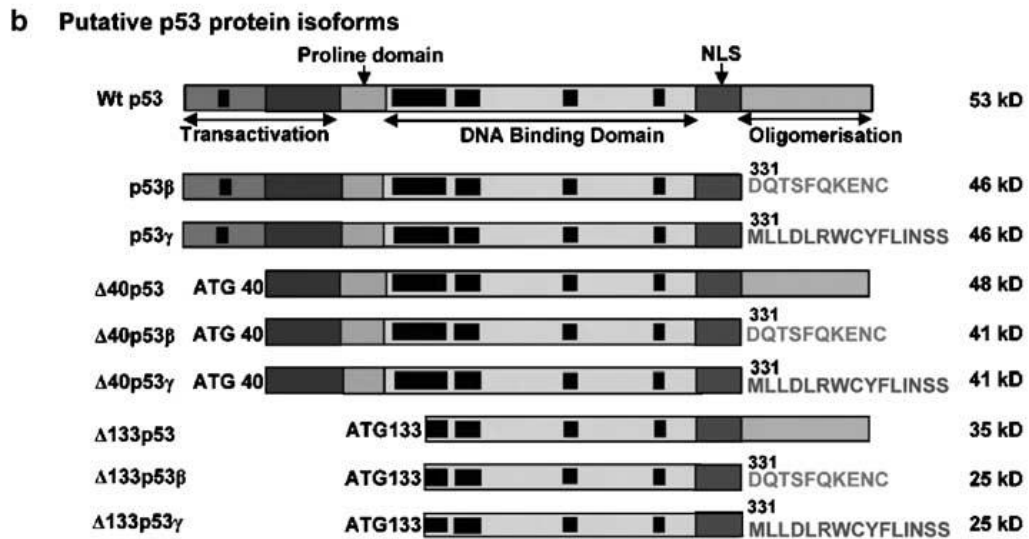


**Obr. 1** - Funkční domény proteinu p53 (převzato z Bode, 2004)

### 1.1.2 Protein p53

p53 byl objeven roku 1979 jako protein, který interaguje s onkogenním T antigenem z SV40 viru (Lane and Crawford, 1979).

Obsahuje 393 aminokyselin, které tvoří několik funkčních domén (Hupp, 1999; Jayaraman and Prives, 1999). N-koncová doména (AMK 1 až ~100) zahrnuje transaktivační oblast (AMK 1-42) a oblast bohatou na prolin s pěti kopiemi sekvence PXXP (AMK 61-92). Vývojově vysoce zachovaná centrální doména (AMK ~100-300) se účastní sekvenčně-specifické vazby na promotory genů regulujících p53 (El-Deiry et al., 1992). Bodové mutace v této doméně jsou nejfrekventovanější změny v p53, které způsobují rakovinu (Hainaut et al., 1998). C-koncová oblast proteinu obsahuje pružné spojení (AMK ~300 až ~325), tetramerní doménu (AMK ~325-356) a základní C-koncovou DNA-vazebnou doménu (AMK 363-382). Schopnost C-konce vázat se na jednořetězcové mezery v dsDNA (Zotchev et al., 2000),  $\gamma$ -ozářenou DNA *in vitro* (Reed et al., 1995) a konce ssDNA a katalyzovat DNA řetězcový posun (Bakalkin et al., 1994) pravděpodobně hraje roli proteinu p53 v opravě a rekombinaci DNA (Brázdová et al., 2002). Na C-konci se nachází oligomerizační a regulační doména (Uldrijan et al., 2002).



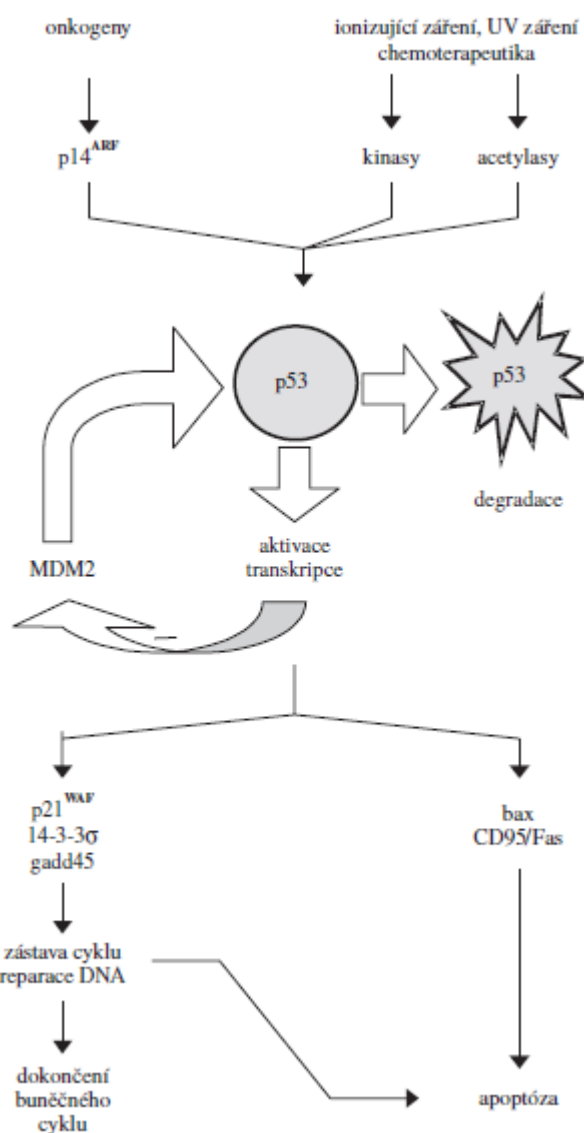
**Obr. 2** - Isoformy proteinu p53 (převzato z Murray-Zmijewski et al., 2006)

Protein p53 hraje významnou roli v buněčném cyklu (G1 nebo G2 fázi). Pokud je nádorový supresor inaktivován, dochází ke ztrátě jeho kontrolního mechanismu. Vzhledem k tomu, že nádorové supresory mají recesivní charakter, k jejich inaktivaci je zapotřebí defekt obou alel.

Pokud je DNA poškozena, buněčný cyklus se zastaví a nedochází tak k replikaci DNA. Poškození DNA indukuje zvýšení koncentrace a aktivity nádorového supresoru p53. Pokud je p53 aktivován, stimuluje transkripci genu kódujícího Cdk-inhibiční protein p21, který se váže na komplex cyklinu S fáze s Cdk, který je zodpovědný za přechod do S fáze a blokuje tak jeho funkci. Zastavení buněčného cyklu v G1 fázi poskytuje buňce čas na opravu DNA ještě dřív, než se zreplikuje (Alberts et. al., 1998), dále zajišťuje adekvátní odpověď buňky na buněčný stres, podílí se na řízení diferenciaci buněk, regulaci transkripce a reparace DNA, udržování stability genomu a zamezuje dělení, případně přežití poškozených buněk (programovaná buněčná smrt - apoptosa). Vyřazení funkce představuje významný krok v progresi kancerogeneze. Protein p53 je transkripční faktor, který po indukcii některými buněčnými stresy (např. hypoxie, nedostatek nukleotidů, poškození mitotického vřeténka, aktivace onkogenů a především poškození DNA) spouští transkripci svých cílových genů a to prostřednictvím vazby na specifické sekvence DNA v jejich promotorech (Šmardová, 2003).

### 1.1.3 Regulace p53

Aktivita p53 může být inhibována nebo stimulována řadou různých mechanismů. Díky některým mutacím dochází k narušení funkčních domén. Dalším faktorem ovlivňujícím aktivitu p53 je MDM2, který zabraňuje kontaktu N-koncové domény s bazálním transkripčním aparátem. Zdá se, že pouze tetramerním spojením p53 s cílovými sekvencemi DNA je protein plně aktivní jako transkripční aktivátor či represor (Uldrijan et al., 2002; Bode and Dong, 2004).



**Obr. 3** - Regulace proteinu p53 (převzato z Uldrijan et al., 2002)

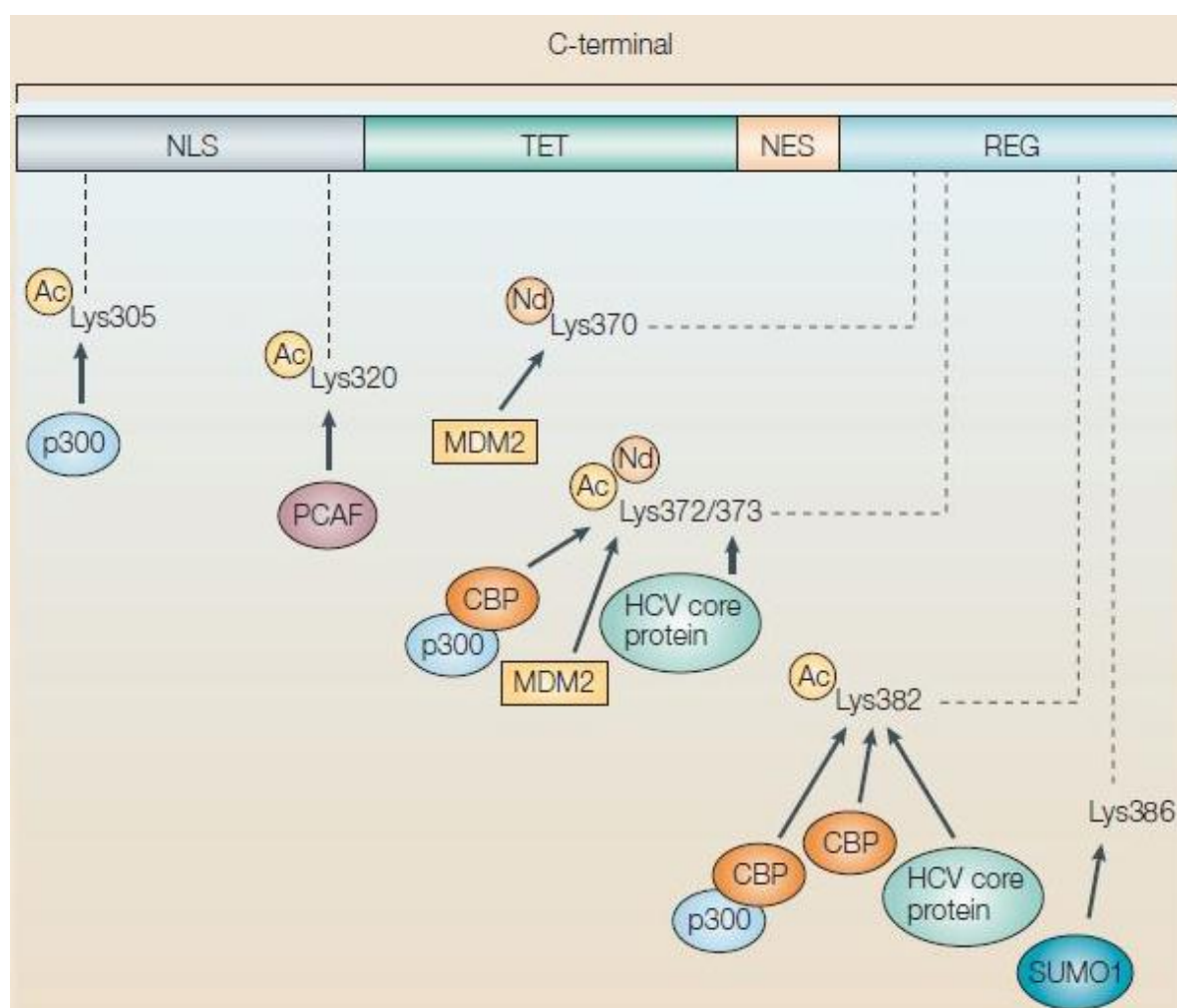
Aktivita p53 je značně regulována posttranslačními úpravami, protein-proteinovou interakcí a proteinovou stabilizací (Watson and Irwin, 2006). Posttranslační úpravy p53 zahrnují kovalentní připojení funkčních skupin k proteinu p53 po jeho translaci. Nejběžněji zmíněné posttranslační modifikace p53 zahrnují fosforylaci serinů, zejména serinu 315 kinasami CDK1 a CDK2, serinu 378 kinasou C a serinu 392 kasein kinasou II a/nebo threoninů a acetylaci lysinů 320 a 382 acetyltransferasou p300 (Bode and Dong, 2004; Uldrijan et al., 2002), ubiquitinaci a sumoylaci lysinových zbytků. Ačkoli je fosforylace proteinů spojena s přežitím buněk a proliferace je běžně regulována tyrosin kinasami, doteď není známo, že by jeden z devíti tyrosinů v p53 podléhal fosforylaci. Jiné známé modifikace p53 zahrnují glykosylaci a ribosylaci, ale význam těchto modifikací v kancerogenezi je nejasný (Bode and Dong, 2004).

V normálních savčích buňkách je hladina proteinu p53 velmi nízká díky stálé degradaci proteasomem 26S (Bode and Dong, 2004). K tomu je nezbytná ubiquitinace, tj. kovalentní připojení ubiquitinu k lyzinům cílového proteinu. Pro připojení ubiquitinu k cílovým proteinům je nutná aktivita tří různých enzymů označovaných jako E1 (enzym aktivující ubiquitin), E2 (enzym přenášející ubiquitin) a E3 (ubiquitin ligasa). Ubiquitin ligasovou aktivitu, důležitou pro degradaci p53, vykazuje protein MDM2 (mouse double minute 2). Exprese proteinu MDM2 je transkripčně indukována proteinem p53 (Barak et al., 1993) a protože se MDM2 zároveň podílí na jeho degradaci, vzniká tak zpětnovazebná regulační smyčka, která omezí působení proteinu p53 v buňce pouze na dobu nutnou pro iniciaci transkripce cílových genů (viz Obr. 3). Dlouhodobé působení aktivního proteinu p53 v buňce totiž může indukovat apoptosu, která je však nežádoucí v případě menšího poškození způsobeného stresovým faktorem, který lze odstranit. Samotná vazba proteinu MDM2 na p53 pouze blokuje jeho transkripční aktivitu a ke spuštění procesu degradace je nutný transport komplexu p53-MDM2 z jádra buňky do cytoplazmy. Neschopnost některých mutantních forem proteinu p53 aktivovat expresi MDM2 vede k jejich akumulaci v nádorových buňkách ve velkém množství (Uldrijan et al., 2002).

Siva1 se váže na MDM2 a zvyšuje degradaci proteinu p53 zprostředkovanou proteinem MDM2. Siva1 významně inhibuje genovou expresi, apoptosu a inhibici buněčného růstu způsobené proteinem p53. Siva1 se také váže na Bcl-XL a inhibuje apoptosu, kterou zapříčinil protein Bcl-XL jako ochranu proti UV záření (Du et al., 2009). Byly popsány další E3 ubiquitinové ligasy, k těm patří Pirh2 a COP1, které se podílí na negativní autoregulaci zpětnovazebné smyčky analogicky jako MDM2. U rakoviny byly popsány

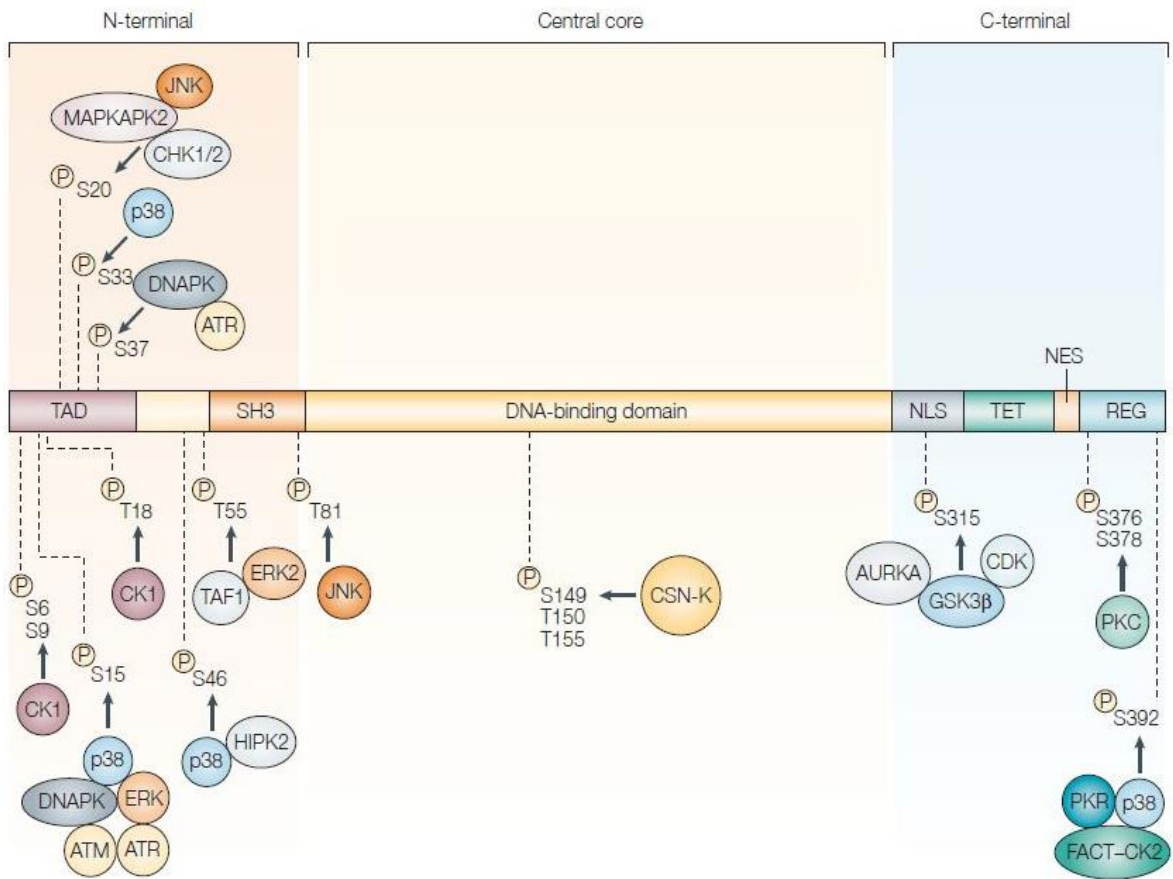
změny v p53 specifických E3 ligasach. Amplifikace MDM2 byla pozorována u 7 % lidských nádorů, nadměrná exprese COP1 u nádorů prsu a vaječnicků a Pirh2 u plicních nádorů (Watson and Irwin, 2006).

Funkce p53 je regulována nejméně dvěma UBL (ubiquitin-like) proteiny - SUMO-1 a NEDD8. SUMO-1 se kovalentně váže na p53 na C-konci (K386) a zvyšuje tak transkripční aktivitu p53. Také NEDD8 se kovalentně váže na p53 a reguluje tak aktivitu p53 (Watson and Irwin, 2006). NEDD8 může být kovalentně vázán na Lys370, Lys372 a/nebo Lys373 proteinu p53 (Bode and Dong, 2004).



**Obr. 4** - Acetylace p53 (převzato z Bode and Dong, 2004)





**Obr. 5** - Fosforylace p53 (převzato z Bode and Dong, 2004)

**Tab. 2** – Regulytory p53 (upr. Bode & Dong, 2004; Bénard et al., 2003; Du et al., 2009; Uldrijan et al., 2002)

Regulytory p53	Mechanismus působení na p53	Efekt na úrovni p53	Regulytory p53	Mechanismus působení na p53	Efekt na úrovni p53
ARF	podpora sumoylace MDM2	prostř. MDM2	MDMX	vazba na p53	inhibice SST
ATM	fosforylace (Ser 15)	stabilizace, aktivace SST	NEDD8	vazba na p53 (Lys 370, 372, 373)	stabilizace, aktivace SST
ATM	fosforylace MDM2	prostř. MDM2	p14ARF	acetylace (Lys 382)	stabilizace, aktivace SST
ATR	fosforylace (Ser 15, 37)	stabilizace, aktivace SST	p300	acetylace (Lys 382)	stabilizace, aktivace SST
AURKA	fosforylace (Ser 315)		p300/CBP	acetylace (Lys 373, 382), sumoylace	aktivace SST
BAX	fosforylace (Ser 15)		p33ING1	vazba na p53	aktivace SST
Bcl-2	blokáce importu p53 do jádra	inhibice SST	p38	fosforylace (Ser 392)	aktivace SST
bFGF	indukce exprese MDM2	prostř. MDM2	p38 kinasa	fosforylace (Ser 15, 33, 46, 392)	aktivace SST
BRCA1	vazba na p53	aktivace SST	PARP	vazba na p53	stabilizace, aktivace SST
BRCA2	vazba na p53	inhibice SST	PCAF	acetylace (Lys 320)	aktivace SST
c-Abl	vazba na p53, půs. proti MDM2	stabilizace, aktivace SST	PCAF	acetylace (Lys 320)	aktivace SST
Casein kinase I	fosforylace (Ser 6, 9, Thr 18)		PID/MTA2	deacetylace	
Casein kinase II	fosforylace (Ser 392)	aktivace SST	PKC	fosforylace (Ser 376, 378)	
CDK7/CycH/p63	fosforylace (Ser 33)	aktivace SST	PKR	fosforylace (Ser 392)	
CDKs	fosforylace (Ser 315)	aktivace SST	Protein kinase C	fosforylace (Ser 371, 376, 378)	aktivace SST
CK1	fosforylac (Ser 6, 9, Thr 18)		Rb	částečné působení proti MDM2	stabilizace
c-Myc	indukce p14ARF	stabilizace, aktivace SST	Receptor T3R	indukce exprese MDM2	pūs. prostř. MDM2
CSN-ass. kin. com.	fosforylace (Thr 150, 155, Ser 149)		Ref-1	regulace redoxního stavu	aktivace SST
DNA-PK	fosforylace (Ser 15, 37)	stabilizace, aktivace SST	SIRT1	deacetylace (Lys 382)	
E2F-1	indukce p14ARF	stabilizace, aktivace SST	Siva1	vazba na p53 i MDM2	inh.gen.expr., MDM2
ERK2	fosforylace (Thr 55)		SUMO1	ubikvitinace (Lys 386)	
ERKs	fosforylace (Ser 15)		TAF1	fosforylace (Thr 55)	
FACT-CK2	fosforylace (Ser 392)		TSA	inhibice deacetylace	
GSK3β	fosforylace (Ser 315, 376)		WAF1 (p21)	defosforylace	
HAUSP	deubikvitinace		WT1	vazba na p53	stabilizace, aktivace SST
HDACs	deacetylace	snížení transkripč. aktivity p53			
HIF-1α	vazba na p53	stabilizace			
HIPK2	fosforylace (Ser 46)				
CHK1/CHK2	fosforylace (Ser 20)				
IGF-1	indukce exprese MDM2	prostř. MDM2			
JNK	fosforylace (Ser 33)	stabilizace (stres. buňky)			
JNK	ubokvitinace	destabilizace (nestres. buňky)			
JNK	fosforylace (Thr 81, Ser 20)				
MAPKAPK2	fosforylace (Ser 20)				
MDM2	vazba na p53, export z jádra, ubik. inhibice SST, destabilizace				

### 1.1.4 Mutace p53

p53 je u karcinomů nejfrekventovaněji mutovaným genem (50%) (Murray-Zmijewski et al., 2006) a je inaktivován ve více než 20 % (Watson and Irwin, 2006). Protein p53 podléhá řadě mutací, které postihují specifická místa, kterými se protein váže na DNA, nebo celkově pozmění jeho konformaci a tím znemožní vazbu proteinu s DNA (tzv. mutace „loss-of-function“). Protein p53 tak ztrácí nádorově-supresorovou funkci. Stejně jako u jiných nádorových supresorů dochází k inaktivaci p53 velmi často díky delecii v jeho koncových částech. Nejčastější příčinou ztráty jeho nádorově-supresorové funkce jsou bodové mutace, při kterých dochází k záměně jednoho nukleotidu za jiný a v důsledku ke kódování jiné aminokyseliny. Superaktivní mutace zvyšují nejen specifickou, ale i nespecifickou vazbu na DNA, díky tomu p53 snadněji transaktivuje cílové geny (Šmardová, 2003). K jedné z bodových mutací patří i mutace lokalizovaná na tetramerní doméně vzniklá výměnou argininu na kodonu 337 za cystein (R337C). Takto mutovaný C-konec proteinu se váže k DNA aktivněji než wt p53 (Malčíková et al., 2010).

Mutacemi „gain-of-function“ získává protein p53 onkogenní funkci. Zdá se, že pro „gain-of-function“ je nezbytná N-koncová část proteinu p53 nebo je zprostředkována DNA vazebnou doménou. Ta není u mutantů schopná vázat DNA a zůstává tak „volná“ pro jiné funkce. „Gain-of-function“ nesouvisí s transaktivací, možná spíše s represí transkripce některých genů, ale obecně je přijímána představa, že „gain-of-function“ je realizována mechanismem protein-proteinových interakcí. V těchto interakcích mohou být partnerem p53 další členové téže rodiny – p63, p73 nebo proteiny se zcela odlišnou funkcí jako např. topoizomerasa I. Další mutace jsou podmíněčné, patří mezi ně teplotně senzitivní a chladově senzitivní mutace. Některé z nich nevratně narušují strukturu proteinu, jsou tedy zcela inaktivující, zatímco jiné nechávají jeho strukturu flexibilní a molekula je schopna se za určitých podmínek vrátit do původní struktury, jde o mutace částečně inaktivující. Teplotně senzitivní mutace se jeví jako diskriminující, což se projevuje odlišnou funkčností proteinu na jeho responzivních elementech. Supresorové mutace dokáží navrátit dříve zmutovanou molekulu do částečně nebo zcela funkčního stavu (Šmardová, 2003).

### **1.1.5 Vazba proteinu p53 se superhelikální DNA**

Topologie DNA je důležitá pro rozsáhlé biologické procesy zahrnující transkripci DNA, replikaci, rekombinaci, kontrolu genové exprese a uspořádání genomu (Paleček, 1991). Interakce DNA-protein je často silně ovlivněna superhelicitou. Přebytek energie obsažené v superhelikální DNA (scDNA) může být snížen navázáním proteinu. Jakýkoli vazebný proces, který vyžaduje nebo využívá zkroucení scDNA, je podporován superhelicitou (Bates and Maxwell, 1993).

#### **Sekvenčně specifická vazba (SSDB)**

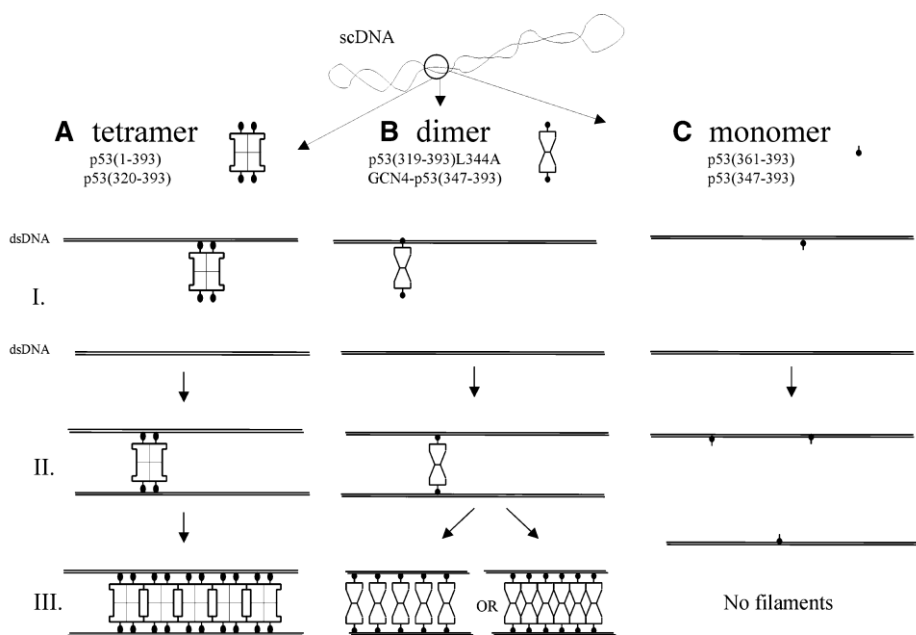
Centrální doména proteinu p53 je zodpovědná za sekvenčně-specifickou vazbu DNA (SSDB – sequence specific DNA binding) s konsensní sekvencí (CON – consensus sequence), která obsahuje dvě kopie sekvence 5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3' oddělené 0-13 bp (el-Deiry et al., 1992). Protein p53 se optimálně váže na tuto sekvenci jako tetramer, s každou polovinou p53-vazebné části interagující se dvěma monomery p53 (Arrowsmith and Morin, 1996).

DNA vazba s proteinem p53 je silně závislá na strukturálních rysech cílové DNA (Nagaich, 1997). Ukázalo se, že protein p53 je schopný vázat se sekvenčně-specificky na cílové oligonukleotidy obsahující smyčky (Kim et al., 1997). Tato vazba probíhá i v nepřítomnosti protilátky PAb421, která aktivuje p53. p53 $\beta$  se přednostně váže na promotor p21 a Bax než na MDM2, zatímco p53 se přednostněji váže na MDM2 a p21 než na promotor Bax (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Ukázalo se, že fosforylace p53 zvyšuje jeho SSDB. Fosforylace/defosforylace byla detekována v lidských buňkách, ve kterých došlo k poničení DNA díky ionizujícímu záření nebo UV záření (Bode and Dong, 2004).

#### **Superhelikálně-selektivní DNA vazba (SCS)**

Silná vazba p53 na scDNA, která neobsahuje CON, byla nazvána superhelikálně-selektivní vazba (supercoil-selective DNA binding - SCS). SCS/p53 vazba je inhibována některými ionty kovů a oxidací proteinu (Paleček et al., 1999).



**Obr. 6** - Model interakce C-konce p53 s dvouvláknovou scDNA (převzato z Brázdová et al., 2002)

Podle Palečka et al., 1997 se předpokládalo, že preference vazby k scDNA je spojená s lokální superhelikální strukturou. Ukázalo se, že určující faktor pro vazbu SSDB je konformační stav cílové sekvence. Dále se ukázalo, že charakteristický rys křížové formy zahrnující cílovou sekvenci, stejně jako křížová forma samotná, představuje známá p53-vazebná místa. Usuzuje se, že přítomnost křížové formy v scDNA cílové sekvenci zlepšuje SSDB. Křížová forma však není jediným faktorem, který zvyšuje sílu této vazby. Křížové formy, které obsahují dvě zaměněné baze v každé své větvi, mají lepší vliv na vazbu než dokonalá křížová forma (přehledný článek Paleček et al., 2004).

Centrální doména rozeznává p53CON sekvence, zatímco C-konec upevňuje SSDB vazbu tím, že interaguje s lokální superhelikální strukturou. C-konec také může pozitivně regulovat sekvencně-nespecifickou vazbu s scDNA. Protein p53 se váže prostřednictvím centrální domény i C-konce. Struktury, které vytváří superhelikální DNA (dvouřetězcové cílové sekvence a jednořetězcové úseky), mohou být velmi blízko sebe, a proto je možné, že vazba C-konce a centrální domény probíhá současně.

Podle Brázdové et al., 2002 je zřejmé, že p53b(1-393) vykazuje vysokou selektivitu pro scDNA v kompetici s linDNA. Na druhou stranu p53(1-363), postrádající C-koncovou DNA vazebnou doménu (AMK 363-382), vytvářel jak komplex p53-scDNA,

tak i p53-linDNA s nízkou preferencí k scDNA. Nízká preference k scDNA byla zjištěna i u fragmentů proteinu p53(45-349) a p53(94-312), které obsahovaly centrální doménu.

Z výsledků plyne, že C-koncová oblast se významně uplatňuje při SCS vazbě. K podrobnější analýze byly použity fragmenty p53(44-393) a p53(320-393) zbavené N-koncové oblasti. Oba proteiny vykazovaly vysokou selektivitu k vazbě s scDNA v kompetici s linDNA. Z toho vyplývá, že posledních 70 aminokyselinových zbytků (320-393) C-koncové části postačuje k SCS vazbě. Fragment p53(319-382), který postrádá posledních 11 AMK C-konce, se také selektivně vázal k scDNA, z čehož lze usuzovat, že extrémně koncové AMK C-konce nejsou nezbytné pro SCS vazbu, na vazbě se podílí AMK 375-378.

Na SCS vazbu má také vliv oligomerní stav proteinu p53. Nejen tetramery, ale také dimery vykazují SCS vazebnost. Z toho vyplývá, že tetramerní doména může být nahrazena doménou dimerní. Monomerní proteiny však nevykazují žádnou preferenci k scDNA.

Než se přišlo na sekvenčně-nespecifickou vazbu (SCS), byly vazebné interakce zkoumány na krátkých oligonukleotidech. Vzhledem k tomu, že superhelicita má vliv na vazbu p53-DNA, bylo zapotřebí vazebné interakce zkoumat na superhelikální DNA.

## **1.2 p63**

Homologem proteinu p53 je protein patřící do téže rodiny, p63. Je velmi důležitý pro vývoj kůže a její proliferaci.

### **1.2.1 Gen p63**

Lidský gen p63 se skládá z 15 exonů, zahrnuje více než 270 000 bp na chromozomu 3q27. Lidský gen p63 exprimuje nejméně tři alternativně střižené isoformy C-konce ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) a může být transkribován od alternativního promotoru lokalizovaného v intronu 3. Transaktivační isoformy (TAp63) jsou vytvořeny aktivitou promotoru po směru exonu 1, zatímco alternativní promotor v intronu 3 vede k expresi isoformem zkrácených o koncové AMK ( $\Delta$ Np63) postrádající transaktivační doménu (Murray-Zmijewski et al., 2006). Gen p63 kóduje nejméně šest otevřených čtecích rámců: užitím dvou odlišných promotorů/ATG v kombinaci se třemi alternativními sestřihy C-konce (TA- $\alpha$ , TA- $\beta$ , TA- $\gamma$ ,  $\Delta$ N- $\alpha$ ,  $\Delta$ N- $\beta$ ,  $\Delta$ N- $\gamma$ ) (Levrero et al., 1999).

### 1.2.2 Protein p63

Proteiny p53, p63 a p73 mají několik stejných funkčních domén: transkripční, DNA-vazebná a oligomerizační doména (Morgunková, 2005). Tyto proteiny jsou identické s doménami p53 přibližně ve 25 %, 60 % a 35 % aminokyselin (Watson and Irwin, 2006). Oligomerizační doména váže protein do tetrameru, DNA-vazebná doména váže tetramer s cílovým genem a transkripční doména (pokud existuje) se podílí na zahájení transkripce. Všechny  $\alpha$ -isoformy p63 a p73 také obsahují SAM-doménu (sterile alpha motiv) (Morgunková, 2005), která většinou funguje jako protein-proteinový vazebný motiv (Watson and Irwin, 2006) a nejspíš je důležitá i pro vývoj savců (Ying et al., 2005). p63 nemá funkci nádorového supresoru, ale onkogenu (Westfall et al., 2005).

Rozdíly mezi p53 a p63 se staly zřejmé po analýze p63<sup>-/-</sup> myši. Zatímco p53<sup>-/-</sup> myši jsou vývojově normální, ale náchylné na neoplastické choroby, p63<sup>-/-</sup> myši mají několik vývojových abnormalit. p63<sup>-/-</sup> myši se narodí, ale krátce poté uhynou a mají odlišnosti ve vývoji končetin a různých epitelových tkáních jako je kůže, prostata, prsní žlázy a urothel (Westfall et al., 2005). Také podle výsledků Candi et al., 2006 se u p63<sup>-/-</sup> myši nevyvinula epidermis ani ostatní deriváty ektodermu (kůže, srst, zuby, mléčné, slzné a slinné žlázy), velmi narušen byl také vývoj končetin a opět krátce po narození myši uhynuly. Exprese  $\Delta Np63\alpha$  zajistila alespoň vývin bazální vrstvy epidermis, zatímco výsledkem exprese TAp63 $\alpha$  byly pouze řídké skupinky velmi málo diferencovaných keratinocytů.

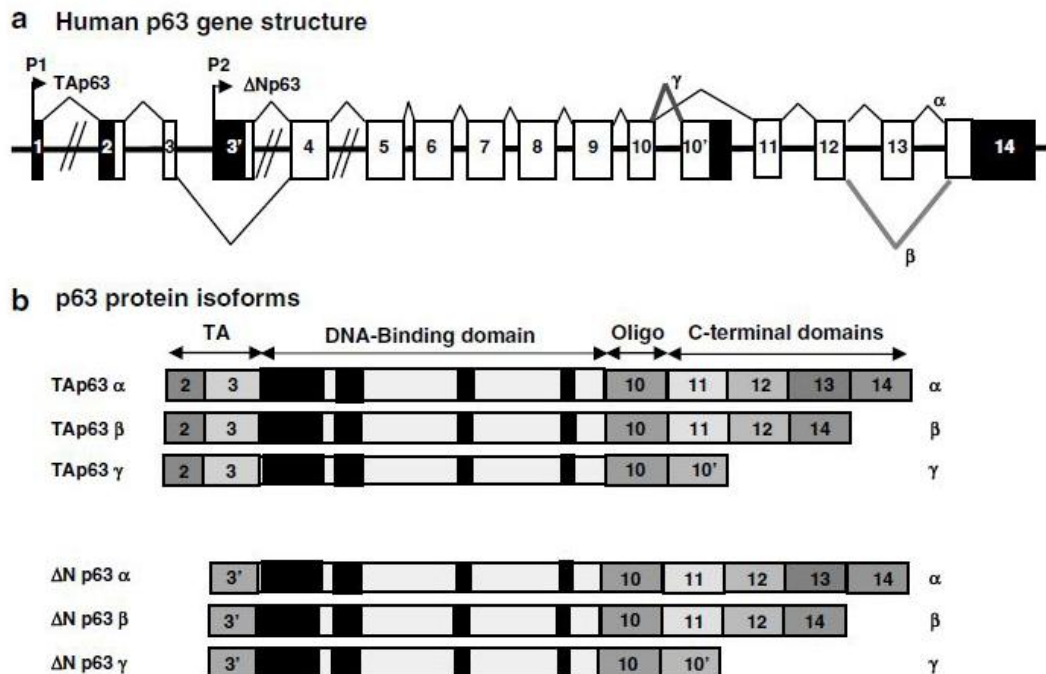
Výsledky Kai-Hong et al., 2007 ukazují, že u myši starých čtyři týdny (kdy epidermis začíná zrát – jsou přítomny keratinocyty) je p63 hojně exprimován v jádrech bazální vrstvy keratinocytů a mizí se stratifikací. p63<sup>+</sup> buňky sídlí hlavně v jádrech buněk ve vrstvě *stratum germinativum*, která je zodpovědná za stálé obnovování epidermis. Některé p63<sup>+</sup> buňky byly nalezeny také kolem sekreční části potních žláz v retikulární vrstvě epidermis. V normální lidské kůži byla pozorována exprese p63 v myoepiteliálních buňkách sekreční části potních žláz. Keratinocyty mající vlastnosti kmenových buněk jsou přítomny nejen ve specifických oblastech vnějšího epiteliálního pláště, ale také ve vlasových cibulkách a potních žlázách, což indikuje úzký vztah mezi p63 a epidermálními kmenovými buňkami (So-Young et al., 2009).

### 1.2.3 Isoformy p63

Každá z isoform p63 vykazuje specifickou biologickou a biochemickou aktivitu (Murray-Zmijewski et al., 2006)

Isoformy p63  $\Delta N$  zkrácené o N-konec postrádají TA doménu, všeobecně mají antiapoptotické vlastnosti (Watson and Irwin, 2006) a jsou dominantně negativními inhibitory TA isoform (Petitjean et al., 2007). Obě isoformy TA a  $\Delta N$  p63 a p73 se mohou vázat na p53 DNA-vazebná místa, jen TA isoformy mohou transaktivovat promotory cílových genů p53 a indukovat apoptosu. Některé  $\Delta N$  p63 a p73 isoformy mohou transaktivovat cílové geny a v určitých případech i potlačovat růst (Watson and Irwin, 2006). I Guo et al., 2009 se zmiňuje o tom, že isoformy  $\Delta N$  a TA mají odlišné, dokonce opačné vlastnosti.  $\Delta N$ p63 isoformy zvyšují proliferaci a inhibují apoptosu, zatímco TAp63 isoformy apoptosu indukují.

Expres p63 byla zaznamenána v jádrech buněk v bazální a suprabazální vrstvě epidermis a p63 $\alpha$  byly v epidermis roztroušeny (So-Young et al., 2009).



Obr. 7 – Lidský p63 (převzato z Murray-Zmijewski et al., 2006)



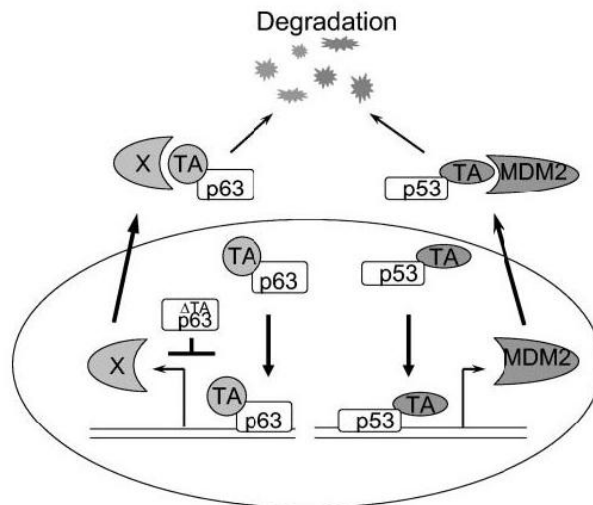
Převládajícím typem p63 v epiteliálních buňkách a v rakovinných buňkách jsou isoformy  $\Delta N$ , které postrádají TA doménu na N-konci, zatímco hladina isoform TA je hluboko pod fyziologickými podmínkami. TAp63 $\alpha$  je degradován v proteasomu. Specifická DNA vazba a transkripční aktivity TAp63 $\alpha$  jsou nezbytné pro jeho proteinovou degradaci. TAp63 $\alpha$  má silnou DNA-vazebnou aktivitu a je lokalizován v jádře. Pro degradaci proteinu p53 řízenou MDM2 jsou rozhodující tři hydrofóbní AMK uvnitř N-konce p53, F19 W23 L26, které jsou ukryty na rozhraní p53 a MDM2. Navzdory malé shodnosti (25%) N-koncové transkripční domény mezi členy rodiny p53, je motiv FWL dobře zachován. Motiv FWL je rozhodující i pro degradaci proteinu p63 (Ying et al., 2005). p53 má i nepatrný efekt na hladinu TAp63 $\gamma$  mRNA, ale je schopen zprostředkovat proteolytickou destabilizaci TAp63. Tato destabilizace vyžaduje TA doménu p53 (Li et al., 2006).

Hladina  $\Delta Np63$  je během epidermální diferenciace snižována pomocí miR-203 (microRNA) a ubiquitin E3 ligasa přispívá také k její redukci. miR-203 je molekulární přepínač, který přispívá ke snížení aktivity  $\Delta Np63$  (Lena et al., 2008; Boominathan, 2010).

### **Isoformy $\Delta Np63$**

$\Delta Np63$  jako primární varianta p63 je exprimován v dlaždicových epiteliálních buňkách (Westfall et al., 2005), v původní buněčné vrstvě kůže (So-Young et al., 2009), má pro-proliferaci funkci, reguluje stárnutí (Guo et al., 2009) a může působit jako antagonist proti p53 (Westfall et al., 2005). Zatímco TAp63 jsou detekovány v původní buněčné vrstvě kůže jen zřídka. To ukazuje na změny exprese isoform p63 během normální diferenciace buněk (So-Young et al., 2009).

$\Delta Np63\alpha$  je převážně exprimován v řadě nádorových buněk hlavy a krku (Westfall et al., 2005) a indukuje cílové geny zodpovědné za adhezi, proliferaci, konečnou diferenciaci keratinocytů a základy formace membrány. Indukce cílových genů exprimovaných proteinem  $\Delta Np63\alpha$  vyžaduje spolupráci s transkripčními koaktivátory, které jsou exprimovány specificky v odpovídajících časových bodech vývoje. Ačkoli některé koaktivátory isoform TAp63 byly identifikovány, koaktivátory, které spolupracují s  $\Delta Np63\alpha$  během epidermálního vývoje ještě zjištěny nejsou (Kim et al., 2009).



**Obr. 8** – Zpětnovazebný model degradace TAp63α (převzato z Ying et al., 2005)

### Isoformy TAp63

Isoformy TAp63 jsou první, které se exprimují během embryogenese, jsou nezbytné pro iniciaci epiteliální stratifikace (Murray-Zmijewski et al., 2006) a mohou přispět k pozdější diferenciaci kůže (So-Young et al., 2009). Navíc brání konečné diferenciaci, což značí, že jsou vyvážené isoformami  $\Delta$ Np63, které poskytnou odpověď na signály vyžadované pro zrání a diferenciaci embryonální kůže. Isoformy TAp63α a  $\Delta$ Np63α jsou nezbytné pro normální ektodermální vývoj specifických orgánů (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Při vývoji nervové soustavy jsou exprimovány pouze isoformy TAp63α a TAp63γ. Ukázalo se, že TAp63 je nepostradatelný proapoptický protein v neuronech jak samostatně, tak i v kombinaci s p53 (Watson and Irwin, 2006).

TAp63α je regulován stejným zpětnovazebným mechanismem jako je p53-MDM2 zpětnovazebná smyčka (Ying et al., 2005), vykazuje vysokou transkripční aktivitu a řídí expresi proteinů specifických pro vrchní vrstvu epidermis, jako je Ets-1, K1, K10, profilaggrin, involucrin a TG typ 3 a 5. Naopak  $\Delta$ Np63α indukuje, ve velké míře, expresi genů přítomných v bazální vrstvě, jako je K14 (Candi et al., 2006).

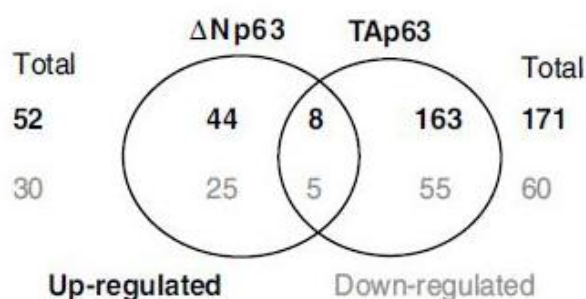
Podle Guo et al., 2009 jsou isoformy TAp63 účinnými induktory stárnutí. Na rozdíl od p53, který indukuje stárnutí jako odpověď na onkogenní podněty, TAp63 může vyvolat stárnutí jako odpověď na fyziologické podněty. Isoformy TAp63 vyvolávají stárnutí ve wt

buňkách stejně tak i v buňkách, které ztratily uzlové nádorově-supresivní prvky jako p16, p19 a p53. TA isoformy hrají nepostradatelnou roli v regulaci stárnutí.

### 1.2.4 Regulace p63

Isoformy  $\Delta$ Np63 přímo aktivují specifické cílové geny, které nejsou indukovány isoformami TA. Expresí isoformem TAp63 a  $\Delta$ Np63 má p63 schopnost regulovat spoustu genů, které mají různé funkce a opačné regulační efekty v závislosti na způsobu uplatnění (Murray-Zmijewski et al., 2006).

Některé geny jsou regulovány pomocí TAp63 $\alpha$  a  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . TAp63 $\alpha$  zvyšují aktivitu celkem u 171 genů, z nichž 163 je jedinečných pro TAp63 $\alpha$  a osm je společných s  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . TAp63 $\alpha$  snižují aktivitu 60 genů, z nichž 55 je jedinečných a pět je společných s  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Na rozdíl od  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , který zvyšuje aktivitu menšího počtu genů (52), pravděpodobně pomocí druhé TA domény, z nichž 44 je jedinečných pro  $\Delta$ Np63 $\alpha$  a osm je společných s TAp63 $\alpha$ .  $\Delta$ Np63 $\alpha$  snižuje aktivitu 30 genů, 25 z nich je jedinečných a dalších pět je společných s TAp63 $\alpha$  (Candi et al., 2006).



**Obr. 9** – Diagram genů regulovaných TAp63 $\alpha$  nebo  $\Delta$ Np63 $\alpha$  isoformem v Tet-indukovatelných Saos-2 buňkách (převzato z Candi et al., 2006)

Nejstarší známý gen indukovaný isoformami  $\Delta$ Np63 $\alpha$  během morfogeneze epidermis je PERP (p53 effector related to PMP-22) desmosomální součást, která je rozhodující pro adhezi buněk v epidermis.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  dále indukuje Alox12, který kóduje LOX zahrnutý do formace epidermální bariéry. Během vývoje epidermis  $\Delta$ Np63 $\alpha$  interaguje přímo s oblastí promotoru Alox12 a tato interakce je zodpovědná za indukci Alox12. Jak konečná diferenciace epidermis, tak i formace epidermální bariéry je proces závislý na extracelulárních kationech Ca<sup>2+</sup>. V epidermis je nejvyšší koncentrace těchto kationů

v granulární vrstvě, kde jsou jednotlivé prvky epidermální bariéry produkovány (Kim et al., 2009).

### 1.2.5 Mutace p63

Mutace p63 způsobují šest vzácných autosomálně dominantních vývojových vad:

- Ectrodactyly Ectodermal dysplasia–Clefting syndrome (EEC). EEC syndrom má tři hlavní rysy: Ectrodactyly – chybění prstů (známou také jako anomálii rukou a nohou, kdy vypadají jako klepeto humra), ektodermální dysplazie (vývojové defekty ektodermálně odvozených struktur, což zahrnuje vlasy, zuby, nehty a potní žlázy) a rozštěpy (rozštěp rtu s nebo bez rozštěpu patra).
- Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth malformations (ADULT) – neobvyklé malformace kůže, nehtů, slzných žláz a zubů. ADULT syndrom se liší od EEC tím, že se nevyskytují rozštěpy obličeje.
- Limb–Mammary Syndrome (LMS). LMS pacienti trpí malformacemi rukou/nohou, hypoplasii prsních žláz a bradavek a izolovaným rozštěpem patra, ale netrpí ektodermální dysplazií.
- Hay–Wells syndrome, také zvaný AEC syndrom ankyloblefaronie (částečný nebo celkový srůst očních víček) a ektodermální dysplazie - rozštěp. AEC pacienti mají zakrslé končetiny nebo je nemají vůbec, na rozdíl od pacientů trpících EEC.
- Split-Hand/Foot Malformations (SHFM) – malformace rukou/nohou. Pacienti mají středový rozštěp rukou a nohou, ale žádné další rysy syndromu EEC. SHFM je pravděpodobně způsoben zárodečnými mutacemi p63 z více než 10 %.
- Rapp–Hodgkin Syndrome. Pacienti trpí ektodermální dysplazií, rozštěpem rtu a patra, deformací uší a abnormalitami urogenitálního systému (Murray-Zmijewski et al., 2006).

U syndromu EEC a SHFM jsou často zárodečné linie mutací v p63 lokalizovány v centrální DNA-vazebné doméně. Tzv. „missense“ mutace velmi dobře korespondují se somatickými mutantními hot spots v genu p53, který inaktivuje p53-DNA vazbu a růst p53 supresorové funkce. Ying et al., 2005 zaznamenal tři bodové mutace v DNA-vazebné

doméně TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\alpha$ (R204W), TAp63 $\alpha$ (R304W) a TAp63 $\alpha$ (C306R). Tyto mutace byly nalezeny u EEC syndromu a jsou předurčeny k zániku DNA-vazebné aktivity proteinu p63. Všechny tři mutacní proteiny nevykazují žádnou DNA-vazebnou aktivitu a žádnou detekovatelnou transkripční aktivitu (Ying et al., 2005).

Určité mutace ovlivňují pouze specifické isoformy (např. u AEC jsou mutace v exonu 13, který obsahuje SAM doménu, která je přítomná pouze v  $\alpha$  isoformách). Některé z těchto mutací působí na AMK zbytek tak, že podléhají posttranslačním úpravám, jako je sumoylace a ubiquitinace. Na rozdíl od p53 je regulace stability p63 a p73 ubiquitin-proteasomální cestou popsána méně. Na degradaci isoformem  $\Delta$ Np63 se podílí stratifin, RACK1 a NEDD4. p63 $\alpha$  je sumoylován na lysinu 637. Sekundární sumoylační strana je na lysinu 549. NEDD4 se váže na C-koncový Py motiv p63 (Watson, Irwin, 2006).

### **1.2.6 Vazba p63**

Proteiny p63 se mohou vázat na DNA pomocí p63RE (responsive elements), které propůjčují p63 citlivost na rozdíl od p53RE, které tuto vlastnost nemají. Isoformy  $\Delta$ Np63 se mohou na DNA vázat pomocí p53RE a mohou uplatnit dominantně negativní efekt na p53, p73 a p63 aktivitu pomocí buď kompetice DNA-vazebných míst nebo přímo pomocí proteinové vazby (Murray-Zmijewski et al., 2006).

p63 se na DNA váže jako homotetramer. Isoformy  $\alpha$  a  $\gamma$  interagují s HIPK2. Interakce s SRRP1 vede ke stimulaci koaktivátorové aktivity. Isoformy  $\Delta$ N a TA interagují s WWP1 a PDS5A. p63 vstupuje do vazebné interakce s FUS, HNRNPAB, HNRNPK, SMAD2, SYNCRIP a p53 (z webové stránky Tumor protein p63 – Homo sapiens [Human]).

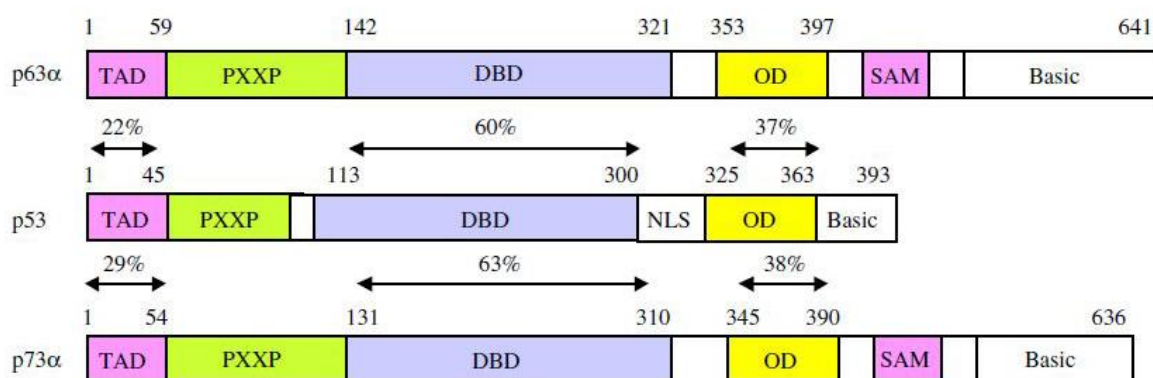
## **1.3 p73**

Poslední protein patřící do rodiny p53 je p73, jehož isoformy mají vliv na vývoj neuronů a mohou se také podílet na apoptose.

### **1.3.1 Gen p73**

Lidský gen p73 se skládá z patnácti exonů, zahrnuje více než 80 000 bp na chromozomu 1p36.3. Tento gen exprimuje nejméně sedm alternativ sestřihu C-konce ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , a  $\eta$ ) a nejméně čtyři možnosti sestřihu N-konce. p73 také může být transkribován

od alternativního promotoru lokalizovaného v intronu 3. Transaktivační isoformy jsou vytvořeny aktivitou promotoru ve směru exonu 1, zatímco alternativní promotor v intronu 3 vede k expresi isoform zkrácených o koncové AMK ( $\Delta Np73$ ), které postrádají transaktivační doménu. Gen p73 exprimuje nejméně 35 variant mRNA, které teoreticky mohou kódovat 29 odlišných isoform proteinu p73. Bylo však zatím popsáno 14 různých isoform p73. Na rozdíl od p63 isoformy p73 mohou obsahovat jiné části N-koncové domény, což může znamenat, že podléhají jiným proteinovým interakcím a mají jinou specifickou aktivitu (Murray-Zmijewski et al., 2006).



**Obr. 10** – Srovnání genové struktury a funkční organizace členů rodiny p53 (převzato z Bénard et al., 2003)

### 1.3.2 Protein p73

Caput et al. identifikoval p73 roku 1997. Stejně jako protein p63 má i p73 shodné domény s proteinem p53. Isoformy p73 $\alpha$ , p73 $\beta$ , p73 $\gamma$ , p73 $\delta$  a p73 $\epsilon$  mají transaktivační doménu, DNA-vazebnou doménu a oligomerizační doménu, které jsou shodné se sekvencemi p53 z 29 %, 63 % a 38 % (Ichimiya, 2000). Uvnitř C-konce se nachází SAM doména, která se u isoformy p73 $\alpha$  skládá ze 487±554 AMK. Jde o kompaktní globulární doménu, která se skládá z pěti helixů, které jsou svázané ze čtyř  $\alpha$ -helixů a malého 3<sup>10</sup> helixu (Levrero et al., 1999).

p73 má stejnou strukturu jako p53, ale jeho odpověď na genotoxické činitele, jako jsou ultrafialové záření a actinomycin D, je odlišná. p73 může indukovat p21 a způsobit tak apoptosu i v p53<sup>-/-</sup> buněčných liniích. Z toho lze vyčíst, že mezi funkcí p53 a p73 je jistá paralela (Ichimiya, 2000). Výsledky prováděné na myších, které postrádaly veškeré isoformy p73, vykazovaly těžké defekty, které zahrnovaly dysgenezi hipokampu,

hydrocefalus, chronické infekce a záněty, abnormality ve feromonových pochodech, ale neukázaly vyšší náchylnost k rakovině (Yang et al., 2000).

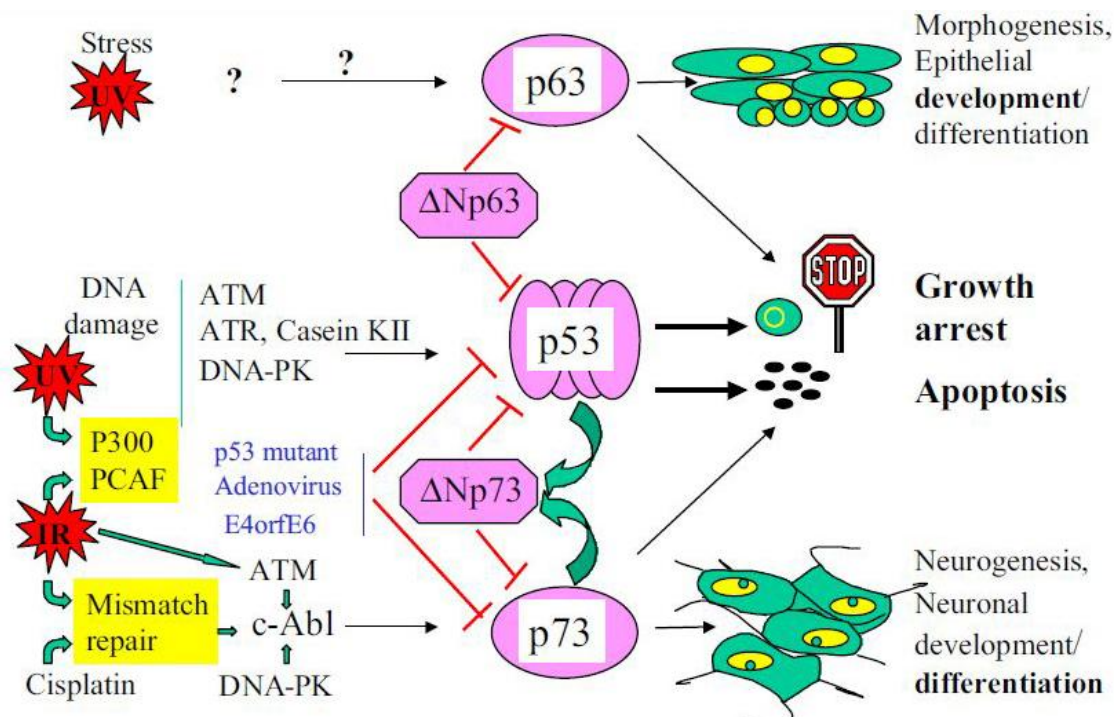
### **1.3.3 Isoformy p73**

Ve srovnání s původní tkání jsou isoformy p73 odlišně exprimovány u mnoha tumorů: močového měchýře, prsu, plic, neuroblastomu a hepatocelulárního karcinomu. Proteiny p73 zkrácené o N-konec –  $\Delta$ Np73, ex2p73 a ex2/3p73, všechny s antiapoptotickou funkcí – mají při rakovině zvýšenou aktivitu. Navíc je ex2p73 nádorově-specifickou formou, která se v normálních tkáních nenachází (Fillippovich et al., 2001). Funkce  $\Delta$ Np73 je důležitá pro přežití tumoru, pravděpodobně díky inhibici apoptotické aktivity proteinů p53 a TAp73 (Casciano et al., 2002). Podle Pozniak et al., 2000 je převládající isoformou p73 při vývoji mozku myši isoforma  $\Delta$ Np73 nikoli proteiny TA.

### **1.3.4 Regulace p73**

Poškození DNA reguluje nejen aktivitu p53, ale i protein p73 a jeho funkci. Byly popsány dva typy regulace p73: akumulace proteinu p73, nebo fosforylace tyrosinu proteinu p73. Oba typy regulace jsou závislé na aktivaci jaderné c-Abl tyrosin kinasy (Levrero et al., 1999).

p73 aktivuje promotory některých p53-responsivních genů, mezi které patří p21, Bax, MDM2, cyklin-G, Gadd45, IGFBP3 (A) a IGFBP3 (B) (Levrero et al., 1999). MDM2 se váže na TA-doménu p73 a dokáže tak potlačit jeho transkripční aktivitu (Ichimiya, 2000).



**Obr. 11** – Schéma pochodů členů rodiny p53 (převzato z Bénard et al., 2003)

p73 je regulován také několika posttranslačními modifikacemi. TAp73 $\alpha$  je fosforylován jako odpověď na poničení DNA, na Tyr-99, zbytku uchovaném v  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , pomocí c-Abl kinasy (Yuan et al., 1999; Agami et al., 1999). Fosforylace Tyr-99 stimuluje transaktivaci a apoptosu řízenou p73. TAp73 $\beta$  je fosforylován na Thr-86 pomocí cyklin A-CDK1/2, cyklin B-CDK1/2 a cyklin E-CDK2, což způsobuje inhibici TAp73 transkripční aktivity (Westfall et al., 2005). Enzymy histon-acetyl-transferas p300 a CREB vazebný protein (CBP) acetylují TAp73 $\alpha$  a tím stimuluji jeho transkripční aktivitu. Dva acetylované zbytky na TAp73 $\alpha$ , lys-321 a 327 jsou uchovány v  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . p73, který není schopen acetylace, je chybou v transaktivaci proapoptotického genu p53AIP1, ale takovýto p73 si ponechává schopnost transaktivovat jiné cílové geny jako je p21 (Costanzo et al., 2002).

Isoformy TAp73 $\alpha$ , ne však isoformy TAp73 $\beta$ , mohou být kovalentně modifikovány díky SUMO-1. Hlavní místo, které je pomocí SUMO-1 modifikováno, v p73 $\alpha$  je lysin na C-konci (Lys-627). Proteasom více degraduje p73, který je modifikovaný pomocí SUMO-1 než nemodifikovaný p73, ačkoli modifikace pomocí SUMO-1 není k degradaci p73 nutná (Minty et al., 2000).

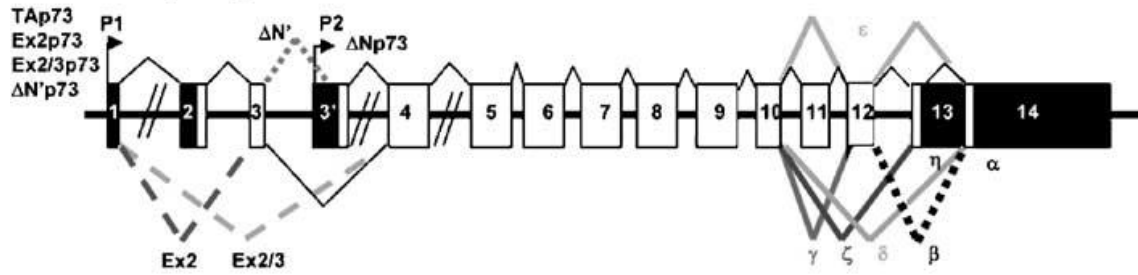


### 1.3.5 Vazba p73

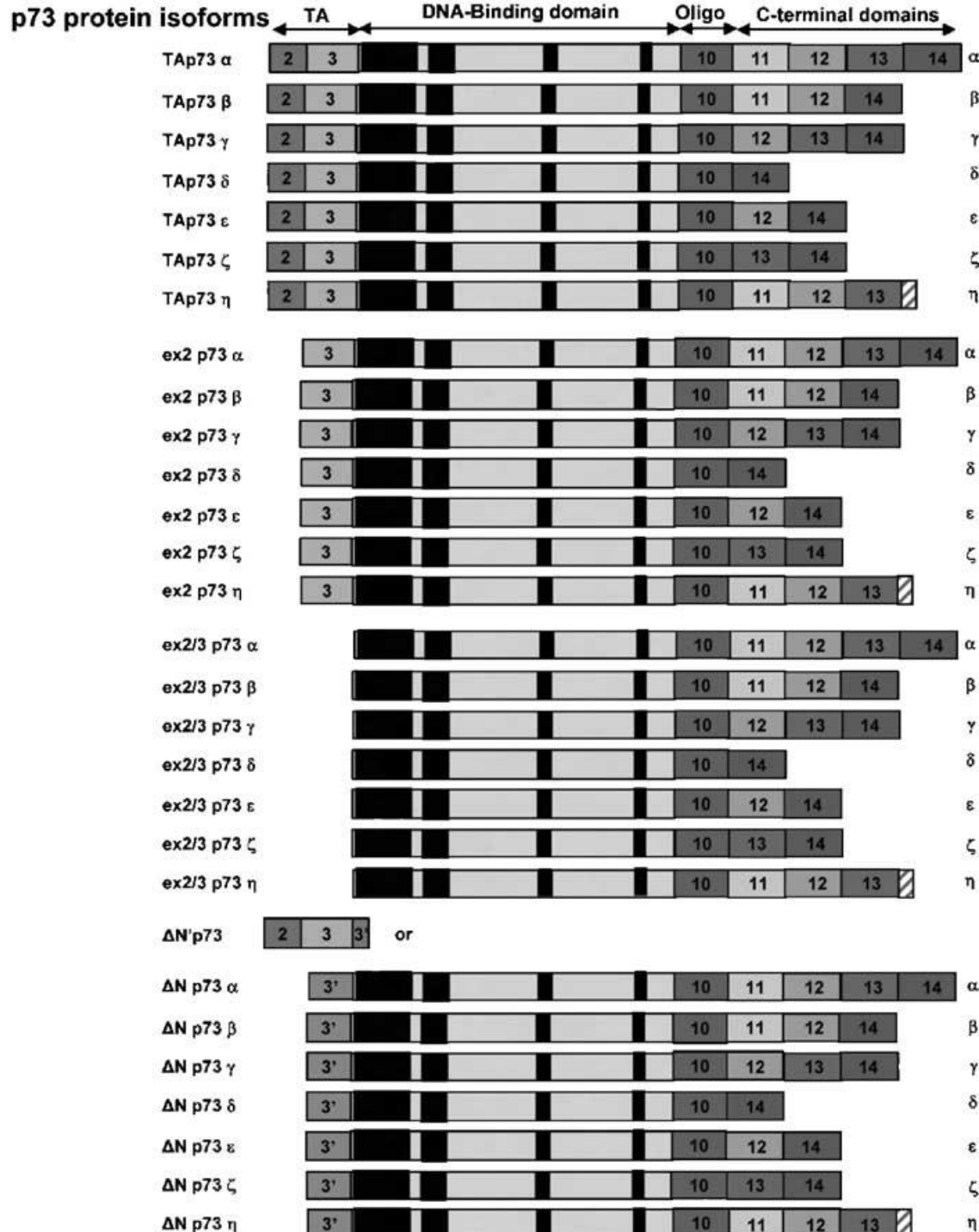
DNA-vazebná doména proteinů p63 a p73 interaguje s p53-responsivními sekvencemi, proto nejspíš tyto dva proteiny regulují p53-responsivní geny (Levrero et al., 1999). p63 a p73 existují jako stabilní tetramery a efektivně interagují za tvorby heterotetramerů. Ani p63 ani p73 nemohou tvořit heterotetramery s p53, protože p53 postrádá důležitý druhý helix v tetramerizační doméně, která v p63 i p73 přítomná je (Coutandin et al., 2009; Joerger et al., 2009)

Podle Murray-Zmijewski et al., 2006 se isoformy TAp73 dokáží specificky vázat na DNA pomocí p53RE a aktivovat transkripci cílových genů. Tato aktivace může indukovat zastavení buněčného cyklu či apoptosu. Isoformy  $\Delta N$  se váží na DNA pomocí p53RE a mohou uplatnit dominantně-negativní efekty na aktivitu p53, p73 a p63. Isoformy  $\Delta Np73$  přímo aktivují cílové geny, které nejsou indukovány isoformami TAp73 (Liu et al., 2004). Isoformy  $\Delta Np73$  se mohou účastnit dominantně-negativního chování kompeticí o DNA-vazebná místa nebo přímo proteinovou interakcí, pak vykazují antiapoptotický charakter (Murray-Zmijewski et al., 2006).

**a Human p73 gene structure**



**b**

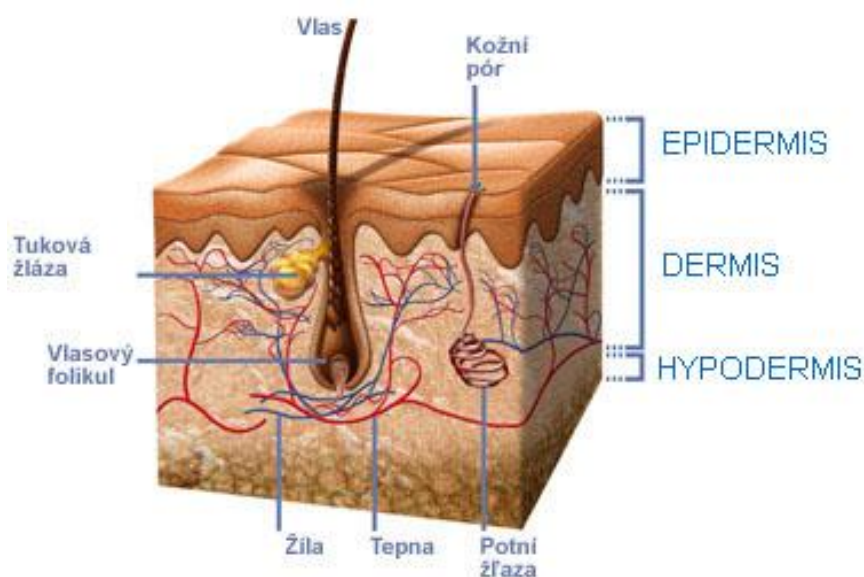


Obr. 12 - a) Struktura lidského genu p73, b) Isoformy p73 (převzato z Murray-Zmijewski et al., 2006)

## 2 LIDSKÁ KŮŽE

Kůže tvoří asi 16 % hmotnosti jedince a zaujímá plochu 1,2 až 2,3 m<sup>2</sup>, proto je největším orgánem lidského těla. Pro lidský organismus je velmi důležitá, protože plní mnoho funkcí: izolace, ochrana, zabránění rozmnožování mikroorganismů, termoregulace, smyslová percepce, exkrece, absorpce.

Kůže se skládá z pokožky (epidermis) a škály (dermis). Dermis vybíhá do epidermis nepravidelnými papilami a výběžky epidermis do dermis se nazývají dermální čepy (lišty). Další součástí kůže jsou deriváty epidermis, mezi které řadíme kožní žlázy (mazové a potní), nehty, vlasy a chlupy. Připojení kůže k přilehlým tkáním je uskutečněno pomocí řídké vazivové tkáně zvané podkožní vazivo (hypodermis). Tato vrstva se však nepovažuje za součást kůže.



Obr. 13 – Lidská kůže (upraveno z webové stránky Bioderma)

### 2.1 Epidermis

Epidermis se skládá ze dvou hlavních vrstev – zárodečná a rohová. Zárodečná vrstva se dále dělí na pět vrstev (*stratum basale*, *spinosum*, *granulosum*, *lucidum* a *corneum*), ve kterých se nacházejí buňky produkující keratin (keratinocyty). Tyto buňky se posunují od *stratum basale*, která naléhá na dermis, až ke *stratum corneum*, která leží pod rohovou vrstvou epidermis.

Keratinocyty v basální vrstvě neudržují jen integritu kůže, ale také regulují chování melanocytů přes volné spojení (gap junctions) a kadheriny. E-kadherin je hlavním kadherinem v lidské epidermis a hlavním mediátorem adheze mezi epidermálními melanocyty a keratinocyty tvořících tzv. adherens junctions (Niessen, 2007).

E-kadherin je důležitý pro morfogenesi a polaritu tkáně. Snížená aktivita nebo mutace E-kadherinu se vyskytuje u mnoha různých nádorů, jako je melanom. UVB způsobuje ztrátu E-kadherinu melanocytů, což během vývoje melanomu vede k jejich uvolnění od vedlejších keratinocytů. Po expozici UVB se exprese E-kadherinu významně snižuje (Gambichler et al., 2008).

V rohové vrstvě se dále buňky posouvají směrem k povrchu, postupně se zplošťují a rohovatí - organizovaný proces buněčné smrti, buňky ztrácejí cytoplasmatické organely i jádro, hromadí se v nich keratin - tento proces se nazývá kornifikace. Během diferenciaci keratinocytů je apoptosa blokována, to zabrání předčasné buněčné smrti a umožní správnou kornifikaci (Lippens et al., 2009). Apoptosa i kornifikace vyžadují aktivitu některých proteas. Během epidermální diferenciaci je snížena aktivita anti-apoptického Bcl-2 a Bcl-X<sub>L</sub>, díky přímé vazbě s cytoplasmatickým p53 (Erster and Moll, 2005) a v suprabasální vrstvě jsou indukovány pro-apoptotické Bax a Bak (Lu et al., 1993) spolu s PUMA, Bik/Nbk a Noxa, všechny transaktivovány jaderným p53 (více přehledný článek o mechanismech bránících apoptose Lippens et al., 2009), ale vyžadují také transaktivaci isoformem p73 (Rocco et al., 2006)

V buňkách epidermis, které se nazývají melanocyty, dochází k syntéze melaninu. Jedná se o pigment, který chrání před UV zářením a který je zodpovědný, spolu s karotenem, za zbarvení kůže. Melanocyty se nacházejí ve *stratum basale* a ve vlasových folikulech. UV záření urychluje syntézu melaninu a také napomáhá exportu melaninu do keratinocytů, což způsobí tmavnutí kůže.

## 2.2 Dermis

Jedná se o velmi dobře prokrvené vazivo, které se dělí do dvou vrstev – vnitřní síťované vrstvy (*pars reticularis*) a zevní bradavkové vrstvy (*pars papillaris*). Mezi *pars papillaris* a epidermis se nachází bazální lamina. V *pars papillaris* se nachází fibroblasty, žírné buňky, makrofágy a leukocyty. Tato vrstva vybíhá do různě vysokých papil. Dvě řady papil pak tvoří papilární lišty, které pozorujeme na konečcích prstů, dlaních a chodidlech

jako tzv. dermatoglyfy. V *pars reticularis* lze najít více kolagenních vláken a méně buněk než v *pars papillaris*.

V dermis se dále nachází krevní a lymfatické cévy, epidermální deriváty (vlasové folikuly, potní a mazové žlázy) a nervová vlákna.

## 2.3 Rakovina kůže

Rakovina kůže je často vyvolána UV zářením (viz kapitola ultrafialové záření). Nádory kůže se dělí na melanomové (maligní melanomy), které vznikají z melanocytů. Jsou to zhoubné nádory, které se šíří do tkání a orgánů, které mohou poškodit a mají sklon k metastázám. Nemelanomové nádory (NMSC), které většinou nemetastázuji, se dále dělí na bazocelulární karcinomy (BCC) a spinocelulární karcinomy (SCC) vznikající z keratinocytů. Mutace genu p53 je základním krokem ke vzniku rakoviny.

U velkého množství SCC má  $\Delta Np63\alpha$  zvýšenou aktivitu. Isoformy  $\Delta Np63\alpha$  jsou nejpočetnější proteiny p63 v primárních lidských keratinocytech a u řady nádorových buněk hlavy a krku. Po působení UV záření dochází k redukci transkripce p63 a ke změnám ve fosforylaci  $\Delta Np63\alpha$ , který je také ubiquitinován. Hladina proteinu  $\Delta Np63\alpha$  je po vystavení UV regulována proteasomovou cestou (Westfall et al., 2005).

Zvýšená exprese  $\Delta Np63\alpha$  je také v buněčné linii spinocelulárních karcinomů hlavy a krku a v těchto buňkách je rozhodujícím faktorem pro přežití – tím, že dojde k potlačení apoptosy, kterou indukuje p73 (Forastiere et al., 2001).

### 3 ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ

Objevitelem ultrafialového záření je Johann Wilhelm Ritter (1776-1810), který byl německým fyzikem, chemikem i filozofem. UV je neviditelné elektromagnetické záření ve spektrální oblasti 10 až 400 nm. Jednotlivé vlnové délky mají odlišné vlastnosti, a proto se UV dělí do několika oblastí:

daleké UV záření (10-200 nm)	extrémní UV záření	10-200 nm
blízké UV záření (200-400 nm)	krátkovlnné UV záření	200-300 nm
	dlouhovlnné UV záření	300-400 nm

Dělí se zejména podle biologických účinků (viz níže) - UVA (320-390 nm), UVB (280-320 nm) a UVC (180-280 nm). UVA se dále dělí na UVA1 (340-400 nm) a UVA2 (320-340 nm) (Runger, 1999). Sluneční záření dopadající na zemský povrch se skládá z 90-99 % z UVA a 1-10 % tvoří UVB. Ozonová vrstva zachycuje velkou část UVB a všechny vlnové délky UVC (Matsui and DeLeo, 1991). Díky tomu, že UVC je zcela pohlceno atmosférou a stratosférou, nemá vliv na lidský organismus.

Ultrafialové záření, po dlouhodobé, či intenzivní krátkodobé expozici, může poškodit DNA a způsobit tak genové mutace, nebo buněčnou smrt. Tento vliv na DNA může vést k dysplasii, imunosupresi, ve vysokých dávkách k zánětu, či rakovině kůže. UVB dokáže vyvolat rakovinu kůže, imunosupresi a genovou mutaci v mnohem menších dávkách než jsou dávky potřebné k vyvolání zánětu. Zánět zvyšuje riziko vzniku maligního nádoru, ale nemusí být způsoben UV zářením (Halliday and Lyons, 2008). UV záření má i pozitivní účinky nejen na lidský organismus, mezi které patří tvorba vitamínu D, urychlení syntézy melaninu, také napomáhá exportu melaninu do keratinocytů, což způsobuje tmavnutí kůže, zpracování vápníku, ale využívá se i k dalším účelům (např. čištění vody).

Epidermis, jako přirozený cíl UV záření, má výjimečný molekulární UV obranný systém, který je odlišný od UV systémů reagujících v jiných tkáních. Reakce na tři různé vlnové délky UV jsou velmi přísně kontrolovány v keratinocytech. I když všechny vlnové délky způsobují poškození DNA a uvolnění cytokinů, bylo zjištěno, že molekulární reakce na UVA je zcela odlišná od reakce na UVB/UVC. Lidské epidermální keratinocyty, které

jsou přirozeně vystaveny UV záření, si vypracovaly vysoce specifickou molekulární odpověď na UVB/UVC jak na úrovni signálů, tak na úrovni genové exprese (Adachi et al., 2003).

Studie Ibuki et al., 2007 ukazují, že redukce poruch DNA závislá na UVA je kriticky důležitá pro fotokarcinogenezi. UVA může v kůži zvýšit aktivitu oprav DNA.

UVA i UVB se mohou podílet na vzniku, propagaci a progresi nádoru jako kompletní karcinogeny. UVB je 100-10 000 krát více karcinogenní než UVA (Sternberg and van der Leun, 1990). Asi 10-20 % z karcinogenních dávek slunečního záření je zapříčiněno UVA (de Laat et al., 1997). UVB přímo excituje DNA, což indukuje fotoprodukty jako jsou dimery cyklobutan-pyrimidin, pyrimidin (6-4) pyrimidon (Matsunaga et al., 1991), cytosin fotohydráty, zlomy DNA, vazby DNA a vazby DNA-protein. Zatímco karcinogenní vlastnosti UVA se považují za nepřímý důsledek oxidačního poškození (Elmets, 1992). Expozice UVA vyvolává velký podíl mutací, které jsou důsledkem oxidativní mutace 7,8-dihydro-8-oxoguaninu (8-oxo-G). Jedná se o transverzi G→T způsobenou špatným párováním 8-oxo-G na templátu s adeninem, nebo transverzi A→C způsobenou špatnou korporací 8-oxo-G jako substrátu, který je opačný adeninu (Epe, 1991; Cheng et al., 1992). Po expozici UVA záření byly v keratinocytech objeveny tři G→T transverze genu p53 (Persson et al., 2002).

Výsledky Kappes et al., 2006 ukázaly, že ve 41 % a 52 % je u UVA i UVB společná C:G→T:A tranzice. Po expozici UVA a UVB bylo nalezeno 7 % a 4 % tandemových mutací CC:GG→TT:AA. Pyrimidinové dimery (dimery cyklobutan-pyrimidinu a fotoprodukty (6-4) pyrimidonu) způsobují mutace C:G→T:A a CC:GG→TT:AA. Dále se ukázalo, že dimery cyklobutan-pyrimidinu nepřispívají jen k UVB mutagenesi, ale také k mutagenesi UVA. C:G→T:A tranzice způsobené zářením UVA i UVB jsou utvářeny stejným mechanismem, konkrétně pyrimidinovými dimery. U p53 se však nachází odlišné reakce na pyrimidinové dimery indukované UVA a UVB zářením. UVB zajišťuje funkci p53 jako „strážce genomu“, ale UVA zvyšuje šanci, že pyrimidinový dimer povede k mutaci, která způsobí pokles zástavy buněčného cyklu a následně se zvýší šance, že se poničený templát replikuje, to vede k menší indukci reparace DNA, která je řízena p53. Tím, že apoptosa je pomocí p53 méně indukována, se zvyšuje riziko, že buňky s poničenou nebo mutovanou DNA přežijí a dojde k rozvoji rakoviny kůže.

Mnoho poškození DNA způsobených slunečním zářením je opraveno díky systému vyřiznutí nukleotidů (NER - nucleotide excision repair system), což je hlavní linie obrany proti genetickým změnám, které jsou způsobeny právě takovýmto poškozením (Sancar, 1995). Pokud nedojde k opravě DNA, toto poškození se přeneso do dceřiné linie a může způsobit rozvoj rakoviny. Důležitou ochrannou funkci proti změnám DNA, které způsobilo UVB, má p53, který aktivuje apoptosu, a jeho koaktivátory, jako je p300, CBP a PCAF (Balint and Vousden, 2001). Na řízení apoptosy se dále podílejí proteiny p63 a p73.  $\Delta Np63\alpha$  se váže na promotory závislé na p53 a ovlivňuje tak zástavu buněčného cyklu i apoptosu. U keratinocytů vystavených UVB je oddělení  $\Delta Np63\alpha$  od promotorů závislých na p53 aktivním procesem, který vyžaduje přímou fosforylaci  $\Delta Np63\alpha$  pomocí p38 MAPK (Papoutsaki et al., 2005).

Údaje podle Abdel-Naser et al., 2003 ukazují, že jeden mechanismus může přímo ovlivnit morfologii, počet, aktivaci melanocytů a syntézu melaninu. Dále lze odvodit, že UVA a UVB mají oddělené účinky na normální lidské melanocyty. Současné studie ukazují, že UVA záření nemá vliv na morfologii melanocytů, nemá přímý vliv na jejich proliferaci, zatímco UVB indukuje významné změny. V závislosti na dávce UVB se snižuje počet melanocytů. Studie *in vivo* však prokázaly, že jak UVA tak i UVB počet melanocytů zvyšují. Pouze vysoká dávka UVA ( $7,2 \text{ J/cm}^2$ ) indukuje mírné zvýšení aktivity aktivačního markeru HMB-45 a snížení aktivity proliferačního markeru Ki-67, zatímco UVB indukuje silnější expresi aktivačního markeru a v závislosti na dávce snížení aktivity proliferačního markeru. Dávka UVB  $7,2 \text{ mJ/cm}^2$  indukuje výrazné zvýšení produkce melaninu, vyšší dávky však syntézu melaninu nemění. Zvýšenou melanogenesi indukují i UVA ale pouze za vyšších dávek (Yanase et al., 2001).



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál a metodika

#### 4.1.1 Protilátky

Při imunohistochemické reakci byly použity komerčně dostupné protilátky proti p53 (klon DO7), p73 a p63 KN $\alpha$ , p63 KN $\Delta$ , p63 KNTA a sekundární anti králičí protilátky (Dako). Jako pozitivní kontrola byl u všech protilátek použit vzorek karcinomu mléčné žlázy.

#### 4.1.2 Pufry

Při práci byly použity tyto pufry: citrátový pufr (citronan sodný, kyselina citronová od firmy Lach-Ner, pH 6-6,2), TRIS (TRIS od firmy P-LAB, HCl od firmy Lachema, pH 7,6), mléčný pufr (nízkotučné sušené mléko od firmy Laktos, TRIS od firmy P-LAB, 5%).

#### 4.1.3 Chemikálie

Byly použity tyto chemikálie: Eagleovo médium modifikované Dulbeccem (Sigma-Aldrich), amphotericin B (Sigma-Aldrich), penicilin (Sigma-Aldrich), streptomycin (Sigma-Aldrich), PBS (Sigma-Aldrich), Ham F12 (Sigma-Aldrich), fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich), adenin (Sigma-Aldrich), trijodothyronin (Sigma-Aldrich), apotransferin (Sigma-Aldrich), hydrokortison (Sigma-Aldrich), inzulin (Sigma-Aldrich), epidermální růstový faktor (Sigma-Aldrich), Bakerův roztok (chlorid vápenatý od firmy Sigma-Aldrich, formol neutrální od firmy Sigma-Aldrich), destilovaná voda (Sigma-Aldrich), parafín (TAMDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Penta), TRIS (P-LAB), ethanol (Lihovar Kojetín), xylen (Penta), streptavidin peroxidasa (BioGenex), DAB (1 ml pufru pro DAB + 1 kapka DAB od firmy Dako), hematoxylin certified (Sigma-Aldrich), TWEEN 20 (Dako), antibody Diluent (Dako), aceton (Lachema), Entellan (Merck).

#### 4.1.4 Přístroje

Solární simulátor SOL-500 vybavený filtrem H2 (Dr. Hönle UV Technology, Německo), UVB metr (Dr. Hönle UV Technology, Německo), laminární box CLF (Schoeller Instruments, ČR), CO<sub>2</sub> Inkubátor Sanyo (Schoeller Instruments, ČR), přístroj pro přípravu trvalých preparátů Bio-Optica PF 100, DP 500, UT 200 (Itálie), mikrotom HM 315 (Microm, Německo), mikrovlnný histoprocessor Histos Pro (Milestone, Itálie), mikropipety (Eppendorf, Německo), orbitální třepačka OS-10 (BioSan, Lotyšsko), analytické váhy PS 2100/C/2 (RADWAG, ČR), komůrka Magnetic Immuno Staining Tray (CellPath, UK), systém OLYMPUS DP manager (Olympus, ČR).

#### 4.2 Příprava kožních explantátů

Explantáty byly připraveny z kůže odebrané devíti pacientům při operacích, které byly provedeny na oddělení plastické a estetické chirurgie Fakultní nemocnice v Olomouci. Lokalizace odebraných vzorků však není známá. Použití explantátů pro experimentální účely bylo schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice v Olomouci a Lékařské fakulty Univerzity Palackého. Pacient projevil svůj souhlas s využitím jeho biologického materiálu pro výzkumné účely tím, že podepsal tištěný informovaný souhlas.

Kůže byla očištěna od podkoží a podkožního tuku. Následně byla vložena do transportního média - Eagleovo médium modifikované Dulbeccem (DMEM) s 1,25 µg/ml amphotericinu B, 500 U penicilinu/ml a 0,5 mg/ml streptomycinu.

Vzorek byl 1 hod inkubován v roztoku s antibiotiky při 4 °C, poté byla kůže vyjmuta a dočištěna. Dále byla kůže opláchnuta sterilním PBS a nastříhána na čtverečky o velikosti cca 1 cm<sup>2</sup>. Kousky kůže byly vloženy na dno kultivační plastové misky a byly zality kultivačním médiem - 60 % DMEM, 20 % Ham F12, 10 % fetální bovinní sérum, 26,4 µg/ml adeninu, 0,136 µg/ml trijodothyroninu, 5 µg/ml apotransferinu, 0,8 µg/ml hydrokortisonu, 0,12 U/ml inzulinu, 0,25 µg/ml amphotericinu B, 100 U/ml penicilinu, 0,1 mg/ml streptomycinu a 1,0 ng/ml epidermálního růstového faktoru.

Explantáty byly v médiu ponořeny tak, aby jejich povrch nebyl pod hladinou. Vzorky byly kultivovány do druhého dne v inkubátoru v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C. Z kultivační misky bylo poté médium odsáto, povrch explantátu byl dvakrát opláchnut sterilním PBS

a kůže byla zalita novým sterilním PBS. Aby byla tkáň ozářena UVB zářením a pro její ochranu před přehřátím byla kultivační miska s explantátem vložena na chlazenou desku pod solárním simulátorem.

### **4.3 Ozáření explantátů**

Na základě předchozích experimentů byly vzorky ozařovány zářením UVB. K ozáření explantátů byl použit solární simulátor s filtrem, který propouští vlnové délky 295 nm - 315 nm. Intenzita UVB záření byla měřena UVB metrem. Doba ozařování byla vypočtena ze vztahu:

$$\text{Dávka (J/cm}^2\text{)} = \text{Intenzita (W/cm}^2\text{)} \cdot \text{Doba (s)}$$

Jako negativní kontrola bez ozařování byl použit vzorek č. 42. PBS bylo po ozařování odsáto a na explantáty bylo aplikováno čerstvé kultivační médium. Po určeném časovém intervalu (30, 60 nebo 90 min – viz Tab. 4) byl explantát vyjmut, opláchnut v PBS a vložen do Bakerova roztoku k fixaci.

Dále byly tkáně odvodněny dvojitým propráním v 96% ethanolu. Poté byla tkáň zalita rozehrátým parafínem (cca 56°C), tímto krokem byla tkáň zpevněna, aby mohla být později krájena na tenké řezy. Následně byly vzorky rychle chlazeny na chladicí plotně, krájeny na mikrotomu a napnuty na podložním skle.

### **4.4 Imunohistochemie**

Řezy byly odparafinovány dvojitou inkubací v xylynu po dobu 5 min. Dvojitým propráním v 96% ethanolu byly preparáty převedeny z hydrofóbní fáze do fáze hydrofilní, v alkoholu byly vždy ponechány 5 min. Poté byly 5 min oplachovány tekoucí vodou a třikrát opláchnuty destilovanou vodou (1 min). Následně byly řezy vařeny v 250 ml citrátového pufru (pH 6-6,2, 120 °C, zvýšený tlak, 14 min) a chlazeny 15 min pod tekoucí vodou. Dále byly inkubovány v 5% peroxidu vodíku, který byl ředěn TRIS pufrem (30 min, 70 rpm). Tento krok zajišťuje lepší přístup tkáňových antigenních determinantů. Dále byly preparáty dvakrát opláchnuty v 10x zředěném TRIS pufrem (5 min), třetí oplach byl proveden v roztoku TRIS + TWEEN 20 a inkubovány v 5% mléčném pufrem (30 min, 70 rpm), tímto krokem lze předejít nespecifickému vychytávání specifické protilátky. Poté byly vzorky dvakrát opláchnuty v 10x zředěném TRIS pufrem (5 min), třetí oplach byl proveden

v roztoku TRIS + TWEEN 20. Bylo přidáno 40  $\mu$ l primární protilátky (p63 KN $\alpha$ , p63 KNA, p63 KNTA, ředění 1:2000 antibody Diluent) a takto byly explantáty inkubovány 60 min při pokojové teplotě na třepačce (70 rpm). Řezy byly dvakrát opláchnuty v 10x zředěném TRIS pufru (5 min), třetí oplach byl proveden v roztoku TRIS + TWEEN 20 a byla přidána sekundární protilátka (anti rabbit). Se sekundární protilátkou byly explantáty inkubovány 60 min při pokojové teplotě na třepačce (70 rtm). Poté byly vzorky dvakrát opláchnuty v 10x zředěném TRIS pufru (5 min), třetí oplach byl proveden v roztoku TRIS + TWEEN 20. Řezy byly ponechány v DAB po určenou dobu (viz Tab. 3) a poté 10 min prány v tekoucí vodě. Následně byly barveny hematoxylinem (3 min), opět 10 min prány v tekoucí vodě, odvodněny ethanolem, acetonem, ponechány 2x v xylenu (5 min), montovány montovacím médiem Entellanem a překryty krycím sklíčkem. Poté byly pozorovány pod mikroskopem a hodnoceny. Jako negativní kontrola byl použit vzorek, u nějž nebyla aplikována primární protilátka.

**Tab. 3** – Doba inkubace v DAB

<b>Protilátka</b>	<b>doba inkubace</b>
KN $\alpha$	10 min
KNA	1 min 30 s
KNTA	3 min 10 s

## **4.5 Příprava Bakerova roztoku**

Do 225 ml pramenité vody byl přidán 1 g chloridu vápenatého a 25  $\mu$ l formolu neutrálního.

## **4.6 Příprava citrátového pufru**

Byl připraven roztok A tak, že bylo naváženo 21,01 g kyseliny citronové a toto množství bylo smícháno s 1 l destilované vody. Roztok B byl připraven tak, že do 1 l destilované vody bylo přidáno 29,41 g dihydrátu citronanu sodného. Pro přípravu požadovaného pH 6-6,2 bylo do 0,5 l destilované vody přidáno 9 ml roztoku A a 41 ml roztoku B.

## **4.7 Příprava TRIS pufru**

K 61 g TRIS byl přidán 1 l destilované vody. Použitím koncentrované kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH na hodnotu 7,6.

## **4.8 Hodnocení**

Hodnocení exprese jednotlivých proteinů, sledované v epidermis, bylo provedeno semikvantitativně metodou křížků, kdy jako pozitivita na + byla hodnocena exprese v 5-30 % buněk, pozitivita na ++ hodnocena exprese v cca 30-60 % a pozitivita na +++ hodnocena exprese v cca 60-100 % buněk. Za nepřítomnost exprese (negativita) byly považovány hodnoty 0-5 %.

Vzhledem k nízkému počtu vzorků statistické hodnocení nebylo provedeno (viz níže diskuse).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 p53

I přes použití vysokých dávek UV záření (viz metodika) nebyla prokázána pozitivita exprese tohoto proteinu ani v jednom z vyšetřovaných vzorků.

### 5.2 p73

Podobně jako u proteinu p53 nebyla pozitivita exprese tohoto proteinu prokázána ani v jednom z vyšetřovaných vzorků.

### 5.3 p63

Na rozdíl od předchozích dvou proteinů byla prokázána exprese p63, kterou shrnujeme v následující tabulce (viz Tab. 4) a ilustrativních fotografiích.

Tab. 4 – Výsledky exprese p63

vzorek	Dávka	doba inkubace	p63K $\Delta$	p63K $\alpha$	p63KNTA
42	Negativní kontrola	0 min	neg	neg	neg
28	200 mJ/cm <sup>2</sup>	30 min	+++	+	neg
1	200 mJ/cm <sup>2</sup>	30 min	+++	neg	+++
2	200 mJ/cm <sup>2</sup>	30 min	+++	neg	+++
3	200 mJ/cm <sup>2</sup>	60 min	+++	neg	+++
4	200 mJ/cm <sup>2</sup>	90 min	+++	neg	+++
5	800 mJ/cm <sup>2</sup>	30 min	+++	neg	+++
6	800 mJ/cm <sup>2</sup>	60 min	+++	neg	+++
7	800 mJ/cm <sup>2</sup>	90 min	+++	neg	+++

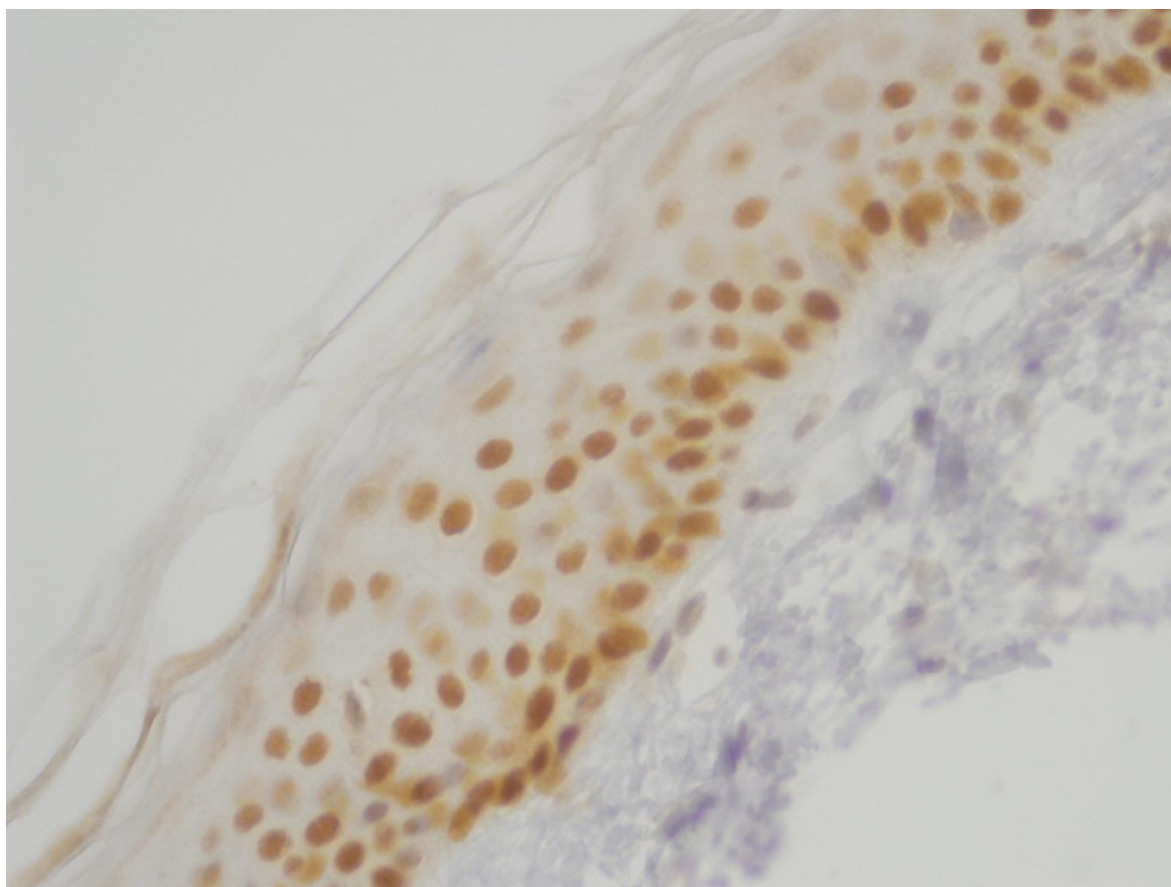
Na základě předchozí zkušenosti laboratoře byl definován typ záření (UVB). Byly použity protilátky: p63 K $\Delta$  reagující s isoformou TAp63 $\alpha$  a polyklonální p63 K $\Delta$  reagující se všemi isoformami  $\Delta$ Np63 a p63 KNTA reagující se všemi isoformami TAp63.

Z výsledků lze vyčíst, že isoformy p63 vykazují ve své expresi jistou uniformitu. Pouze u vzorku č. 28 je exprese isoform TAp63 odlišná od ostatních vzorků. Všude jinde je silně pozitivní na +++, jen v tomto případě je negativní. Isoformy  $\Delta$ Np63 vykazují ve všech vzorcích silnou expresi (+++). Isoforma TAp63 $\alpha$  vykazuje negativitu ve všech vzorcích, kromě vzorku č. 28 (slabě pozitivní +).

Zjevně lze vidět, že na expresi isoform p63 nemá vliv dávka ozáření ani délka inkubace v PBS médiu. Ozáření UVB vyvolává reakci isoform p63, která je isotypspecifická. Isoformy  $\Delta$ Np63 i TAp63 vykazují silnou expresi. Reakce isoformy TAp63 $\alpha$  je však negativní. Proto lze usuzovat, že pozitivní reakci vykazuje isoforma TAp63 $\beta$ , nebo TAp63 $\gamma$ , či obě současně.

Je potřeba dále provést výzkum z expresního profilu a zjistit, jak na UVB ozáření reagují jednotlivé isoformy. Touto pilotní studií bylo prokázáno, že výsledky nejsou zatíženy metodickou chybou, ale že na ozáření UVB reagují samotné isoformy p63 a to mírně odlišným způsobem.

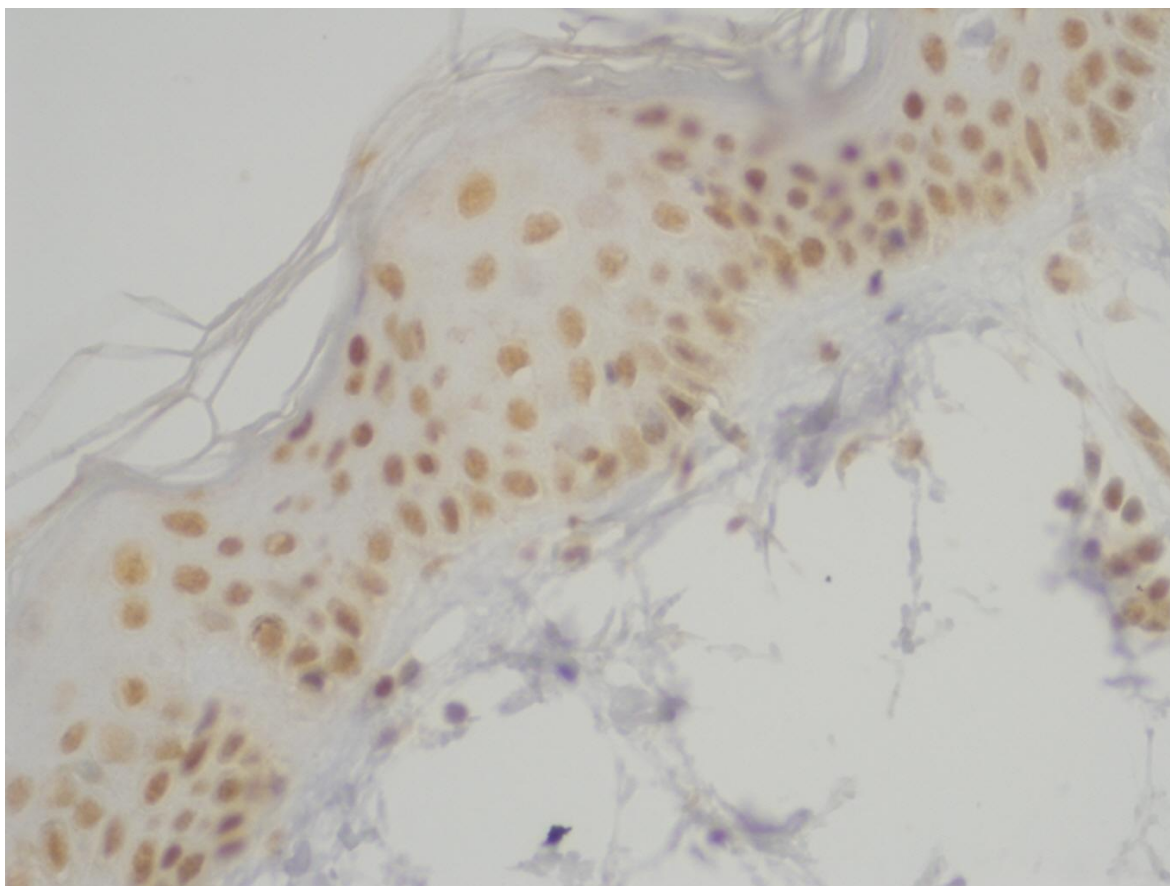
Fotografie byly pořízeny ze vzorků č. 28 a č. 5 systémem Olympus DP manager, zvětšení 400x.



**Obr. 14** – Vzorek č. 5, p63 K $\Delta$

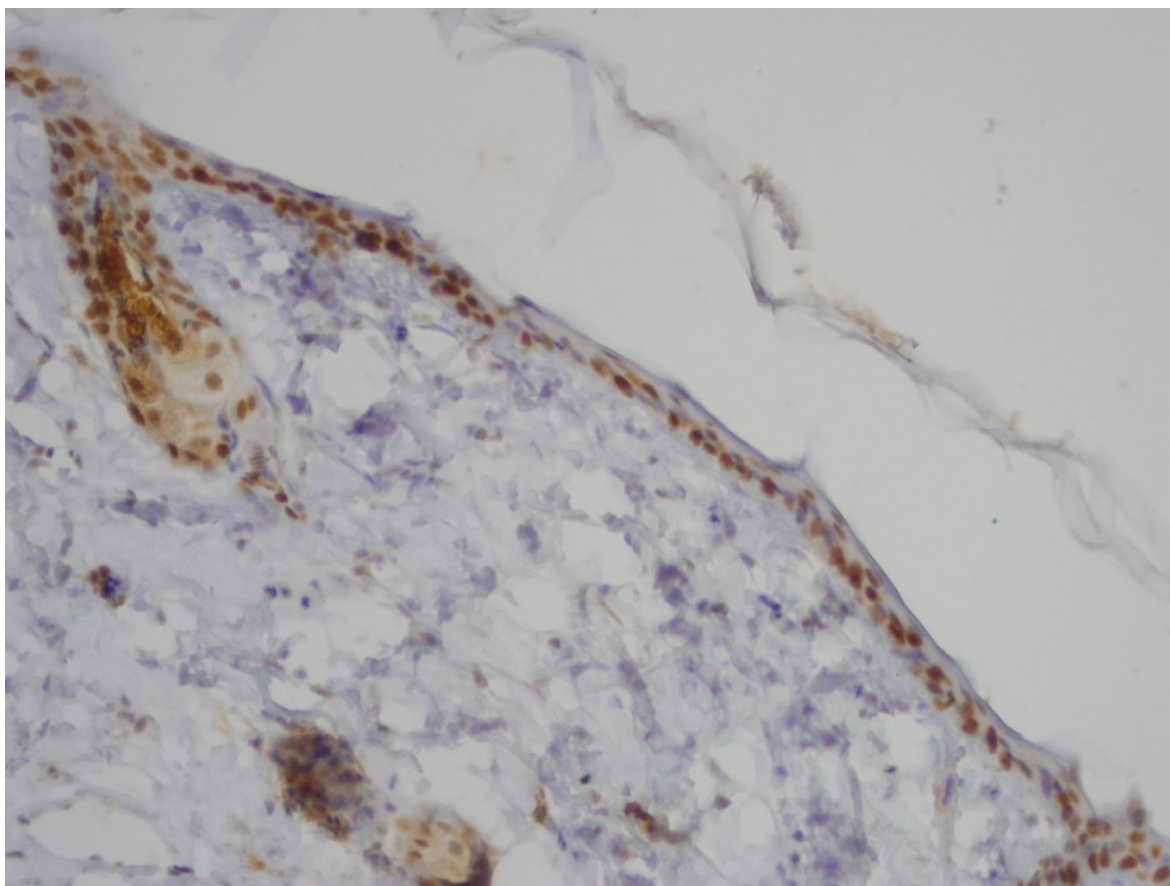
Fotografie vzorku č. 5, který byl ozářen UVB dávkou 800 mJ/cm<sup>2</sup>. Doba inkubace v PBS médiu byla 30 min. Reakce všech  $\Delta$ Np63 isoformem je pozitivní, hodnocena na +++ . V epidermis lze pozorovat expresi  $\Delta$ Np63 isoformem po ozáření UVB v 60-100 % buněk.





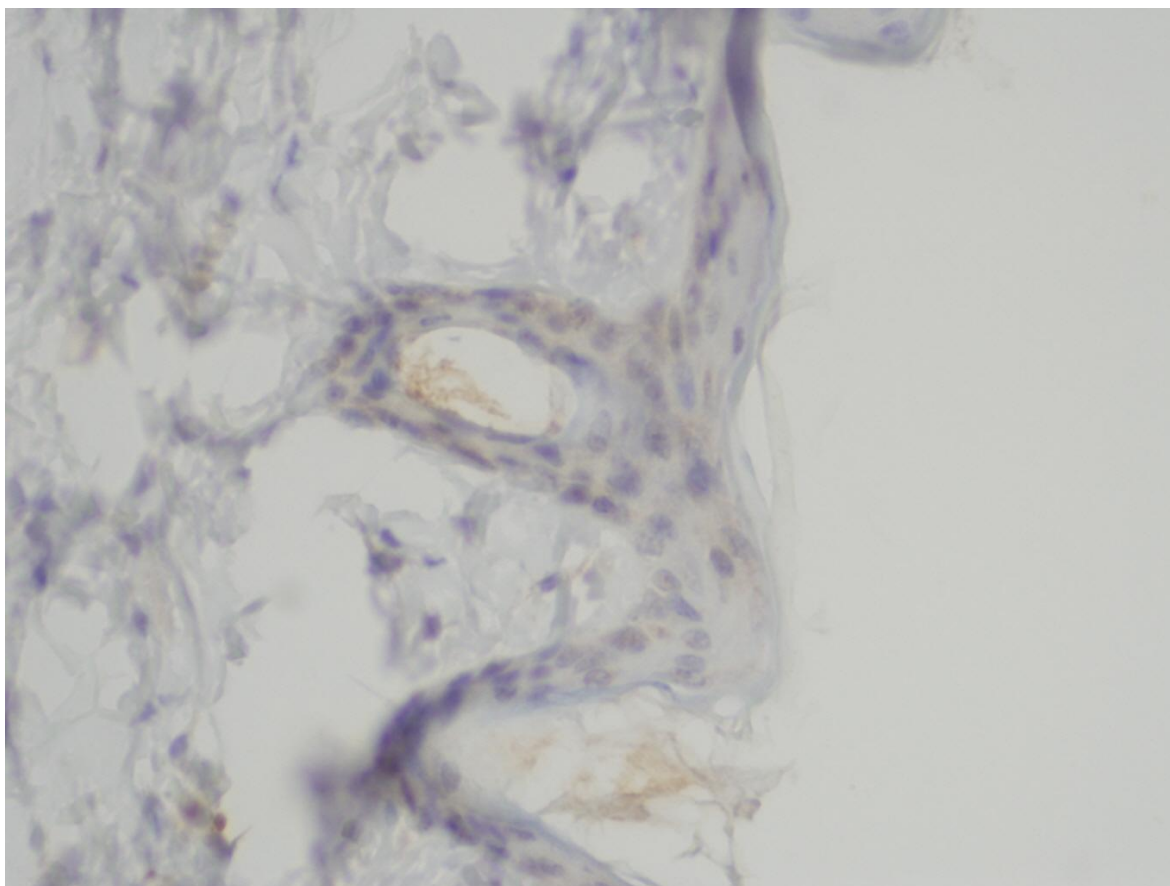
**Obr. 15** - Vzorek č. 5, p63 KNTA

Fotografie vzorku č. 5, který byl ozářen UVB dávkou  $800 \text{ mJ/cm}^2$ . Doba inkubace v PBS médiu byla 30 min. Reakce TAp63 isoform je pozitivní, hodnocena na +++ . V epidermis lze pozorovat expresi TAp63 isoform po ozáření UVB v 60-100 % buněk. Vzhledem k tomu, že reakce TAp63 $\alpha$  na UVB byla negativní, lze usuzovat, že za pozitivní reakci jsou zodpovědné isoformy TAp63 $\beta$  a TAp63 $\gamma$ .



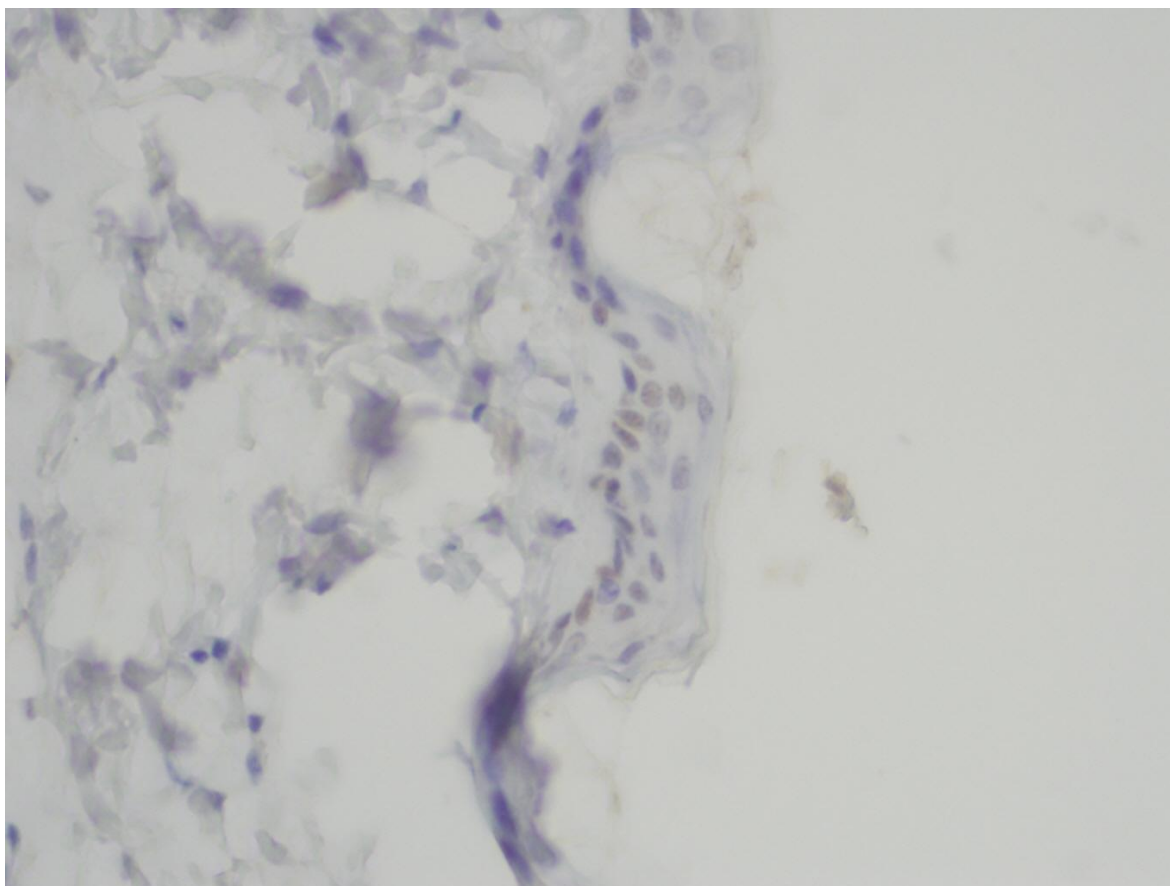
**Obr. 16** - Vzorek č. 28, p63 K $\Delta$

Fotografie vzorku č. 28, který byl ozářen UVB dávkou  $200 \text{ mJ/cm}^2$ . Doba inkubace v PBS médiu byla 30 min. Reakce všech  $\Delta\text{Np63}$  isoformem je pozitivní, hodnocena na +++  
V epidermis lze pozorovat expresi všech  $\Delta\text{Np63}$  isoformem po ozáření UVB v 60-100 % buněk.



**Obr. 17** – Vzorek č. 28, p63 KNTA

Fotografie vzorku č. 28, který byl ozářen UVB dávkou  $200 \text{ mJ/cm}^2$ . Doba inkubace v PBS médiu byla 30 min. Reakce TAp63 isoform je negativní. Skupina isoform TAp63 reagovala negativně, ačkoli isoforma TAp63 $\alpha$  reagovala pozitivně (viz Obr. 18). Jen u vzorku č. 28 lze pozorovat, že skupina isoform může s polyklonální protilátkou reagovat negativně, ačkoli samotná izoforma s epitomem reaguje pozitivně. Při reakci s polyklonální protilátkou mohlo dojít ke zkřížené reakci, i proto by v dalším pozorování bylo vhodné použít epitopy a zaměřit se na reakce jednotlivých isoform p63.



**Obr. 18** – Vzorek č. 28, p63 KNa

Fotografie vzorku č. 28, který byl ozářen UVB dávkou  $200 \text{ mJ/cm}^2$ . Doba inkubace v PBS médiu byla 30 min. Reakce isoformy TAp63 $\alpha$  je pozitivní, hodnocena na +. V epidermis lze u vzorku č. 28 pozorovat expresi TAp63 $\alpha$  po ozáření UVB v 5-30 % buněk, ačkoli skupina isoform TA vykazovala negativní reakci.

## DISKUSE

Pro výzkum regulace exprese nádorových supresorů v lidské epidermis bylo potřeba získat studijní materiál. Vzhledem k tomu, že se v našem případě jednalo o lidskou kůži, bylo nutné informovat etickou komisi i pacienty, kterým byla kůže odebrána, o následném zpracování tohoto biologického materiálu a o tom, že jsou explantáty použity k výzkumné činnosti. Experimentální činnost týkající se projektu, na němž se tato diplomová práce podílí, byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Olomouci a Lékařské fakulty Univerzity Palackého a pacienti, pokud se tohoto výzkumu chtěli účastnit, podepsali informovaný souhlas pro pacienty, ve kterém byl laicky vysvětlen průběh výzkumu. Bez těchto kroků by výzkum nemohl probíhat, protože by došlo k porušení legislativy, ve které jsou zpracována pravidla GCP (Good Clinical Practice - správné klinické praxe) (World Health Organization, 1995).

Vzhledem k tomu, že odebírání vzorků bylo závislé na pacientech – každý se mohl dobrovolně rozhodnout, zda do studie vstoupí, či ne – nepodařilo se odebrat potřebné množství vzorků pro řádné statistické hodnocení. Pro pilotní studii však toto množství bylo dostatečné.

Metodickou částí bylo ověřeno, zda je postup vhodný pro výzkum projektu. V průběhu samotného experimentu se však mohou vyskytnout jistá úskalí, na která je nutno dávat pozor. V první fázi je důležité odhadnout vhodnou intenzitu a dobu UVB ozáření, aby kůže nebyla spálena a aby poté nedošlo k falešně pozitivním výsledkům. Musíme vzít také v úvahu, že vzorky kůže byly odebrány bělochům, takže výsledky nemohou být interpretovány na všechny rasy. Každá rasa má totiž odlišnou pigmentaci kůže. Samozřejmě i v rámci rasy bělochů je kůže variabilní a u jednotlivců může docházet k jistým odlišnostem. Také lokalizace odběru kůže může hrát významnou roli (sluncem ozářená a chráněná kůže) (Mills, 2007).

V další fázi výzkumu regulace exprese nádorových supresorů byla použita metoda imunohistochemie. Jde o dobře známou a léty ověřenou metodu (Dabbs, 2002). Pro imunohistochemické reakce je důležité zařadit i pozitivní a negativní kontroly pro ověření správnosti průběhu a reakce vzorků. I zde může kůže reagovat odlišně.

Při pokusech prováděných na výskyt proteinů p53 a p73 byly reakce negativní. Když byly použity pozitivní a negativní kontroly (explantáty byly ozářeny UVB o velké intenzitě),

reakce byly pozitivní. Bylo tedy zjištěno, že protilátky fungují správně. Jedná se asi o biologický fenomén, kdy p53 a p73 mohou reagovat jinými paralelními cestami (mohou poskytovat jiné signály). Protein p63 však reagoval pozitivně. Experimenty byly provedeny na různé isoformy proteinu p63 a reakce těchto isoform byla mírně odlišná (srov. Westfall et al., 2005). Nelze ale obecně shrnout určitý model odlišností uvnitř p63, protože bylo při výzkumu k dispozici malé množství pacientů a tedy i málo vzorků. Pro další výzkum by bylo vhodné se zaměřit na protein p63 a odlišnost reakcí jeho isoform.

Hodnocení proběhlo jen formou křížků, nebylo použito H-score ani statistické hodnocení. V případě této diplomové práce to nebylo ani relevantní vzhledem k počtu pacientů a k jejímu účelu. Hodnocení je však často velmi subjektivní, což může být dalším úskalím výzkumu.

Z výsledků vyplývá, že UVB záření je zjevně škodlivé a že proteiny rodiny p53 - p53, p63 a p73 jsou k němu různě citlivé. Největší citlivost vykazuje protein p63, jehož isoformy na ozáření UVB reagují odlišně. Touto diplomovou prací byla provedena pilotní studie k projektu Molekulární následky akutní a chronické expozice kůže UVA, UVB a slunečnímu záření: Dynamika změn a pronikání mezi UVA a UVB vlnovými délkami a byl ověřen model metodiky, který je pro grant realizovatelný.

## ZÁVĚR

Touto diplomovou prací se podařilo provést pilotní studii k projektu Molekulární následky akutní a chronické expozice kůže UVA, UVB a slunečnímu záření: Dynamika změn a pronikání mezi UVA a UVB vlnovými délkami. Byl ověřen model metodiky a byla diskutována případná problematika spojená se zvolenými metodami.

Tato práce nebyla pouze literární rešerší, ale jednalo se i o praktickou činnost v laboratoři. Seznámila jsem se proto se základními postupy imunohistochemie a práce s odebranou tkání.

Byly vyhodnoceny změny v odebraných explantátech epidermis po ozáření UVB a byly zhotoveny snímky po imunohistochemické reakci.

Vzhledem k tomu, že bylo k výzkumu zapotřebí lidské epidermis, nebylo odebráno dostatečné množství vzorků pro statistické vyhodnocení výsledků a pro shrnutí obecně platného modelu odlišností reakce isoformem p63 na ozáření UVB.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Abdel-Naser M. B., Krasagakis K., Garbe C., Eberle J., *Direct effects on proliferation, antigen expression and melanin synthesis of cultured normal human melanocytes in response to UVB and UVA light*, Photodermatol Photoimmunol Photomed 19, 122–127 (2003)
- [2] Adachi M., Gaze A., Pintucci G., Shuck A., Shifteh S., Ginsburg D., Rao L. S., Kaneko T., Freedberg I. M., Tamaki K., Blumenberg M., *Specificity in Stress Response: Epidermal Keratinocytes Exhibit Specialized UV-Responsive Signal Transduction Pathways*, DNA and Cell Biology 22, 665-677 (2003)
- [3] Agami R., Blandino G., Oren M., Shaul Y., *Interaction of c-abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis*, Nature 399, 809-814 (1999)
- [4] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie*, 2. vydání, Espresso Publishing, s.r.o., ISBN 80-902906-2-0 (1998)
- [5] Arrowsmith C. H., Morin P., *Oncogene* 12, 1379–1385 (1996)
- [6] Bakalkin G., Yakovleva T., Selivanova G., Magnusson K. P., Szekely L., Kiseleva E., Klein G., Terenius L., Wiman K. G., *p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer*, Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 413-417 (1994)
- [7] Balint E. E., Vousden K. H., *Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein*, Br J Cancer 85, 1813–1823 (2001)
- [8] Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M., *EMBO J.* 12, 461 (1993)



- [9] Bates A. D., Maxwell A., *DNA Topology*, Oxford University Press: New York (1993)
- [10] Bénard J., Douc-Rasy S., Ahomadegbe J-Ch., *TP53 Family Members and Human Cancers*, *Human Mutation* 21, 182-191 (2003)
- [11] Bode A. M., Dong Z., *Post-translational modification of p53 in tumorigenesis*, *Nature Reviews Cancer* 4, 793-805 (2004)
- [12] Boominathan L., *The Tumor Suppressors p53, p63, and p73 Are Regulators of MicroRNA Processing Complex*, *PLoS ONE* 5, 1-13 (2010)
- [13] Brázdová M., Paleček J., Cherny D. I., Billová S., Fojta M., Pečinka P., Vojtěšek B., Jovin T. M., Paleček E., *Role of tumor suppressor p53 domains in selective binding to supercoiled DNA*, *Nucleic Acids research* 30, 4966-4974 (2002)
- [14] Candi E., Rufini A., Terrinoni A., Dinsdale D., Ranalli M., Paradisi A., De Laurenzi V., Spagnoli L. G., Catani M. V., Ramadan S., Knight R. A., Melino G., *Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice*, *Cell Death and Differentiation* 13, 1037-1047 (2006)
- [15] Casciano I., Mazzocco K., Boni L., Pagnan G., Banelli B., Allemanni G., Ponzoni M., Tonini G. P., Romani M., *Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients*, *Cell Death and Differentiation* 9, 246–251 (2002)
- [16] Costanzo A., Merlo P., Pediconi N., Fulco M., Sartorelli V., Cole P. A., Fentemaggi G., Fanciulli M., Schiltz L., Blandino G., Levrero M., *DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes*, *Mol Cell* 9, 175—186 (2002)

- [17] Coutandin D., Lohr F., Niesen F. H., Ikeya T., Weber T. A., et al., *Conformational stability and activity of p73 require a second helix in the tetramerization domain*, Cell Death Differ 16, 1582–1589 (2009)
- [18] Dabbs D. J., *Diagnostic Immunohistochemistry*, 1. vydání, Churchill Livingstone, ISBN 0-443-06566-7 (2002)
- [19] Du W., Jiang P., Li N., Mei Y., Wang X., Wen L., Yang X., Wu M., *Suppression of p53 activity by Siva1*, Cell Death and Differentiation 16, 1493-1504 (2009)
- [20] El-Deiry W. S., Kern S. E., Pietenpol J. A., Kinzler K. W., Vogelstein B., *Definition of a consensus binding site for p53*, Nature Genet. 1, 45-49 (1992)
- [21] Elmets C. A., *Cutaneous photocarcinogenesis*, In: *Pharmacology of the skin*, Mukhtar H., CRC Press, 389- 416 (1992)
- [22] Epe B., *Genotoxicity of singlet oxygen*, Chem Biol Interact 80, 239–60 (1991)
- [23] Erster S., Moll U. M., *Stress-induced p53 runs a transcription- independent death program*, Biochem Biophys Res Commun 331,843–850 (2005)
- [24] Fillippovich I., Sorokina N., Gatei M., Haupt Y., Hobson K., Moallem E., Spring K., Mould M., McGuckin M. A., Lavin M. F., Khanna K. K., *Transactivationdeficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53*, Oncogene 20, 514-522 (2001)
- [25] Forastiere A., Koch W., Trotti A., Sidransky D., *Head and neck cancer*, N Engl J Med 345, 1890–1900 (2001)

- [26] Gambichler T., Rotterdam S., Tigges C., Altmeyer P., Bechara F. G., *Impact of ultraviolet radiation on the expression of marker proteins of gap and adhesion junctions in human epidermis*, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 24, 318–321 (2008)
- [27] Guo X., Keyes W. M., Papazoglu C., Zuber J., Li W., Lowe S. W., Vogel H., Mills A. A., *TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo*, *Nature Cell Biology* 11, 1451-1458 (2009)
- [28] Hainaut P., Hernandez T., Robinson A., Rodriguez-Tome P., Flores T., Hollstein M., Harris C. C., Montesano R., *IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools*, *Nucleic Acids Res.* 26, 205-213 (1998)
- [29] Halliday G. M., Lyons J. G., *Inflammatory Doses of UV May Not Be Necessary for Skin Carcinogenesis*, *Photochemistry and Photobiology* 84, 272-283 (2008)
- [30] Hupp T. R., *Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways*, *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 88-95 (1999)
- [31] Cheng K. C., Cahill D. S., Kasai H., Nishimura S., Loeb L. A., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G to T and A to C substitutions*, *J Biol Chem* 267, 166–72 (1992)
- [32] Ibuki Y., Allanson M., Dixon K. M., Reeve V. E., *Radiation Sources Providing Increased UVA/UVB Ratios Attenuate the Apoptotic Effects of the UVB Waveband UVA-Dose-Dependently in Hairless Mouse Skin*, *Journal of Investigative Dermatology* 127, 2236-2244 (2007)

- [33] Ichimiya S., Nakagawara A., Sakuma Y., Kimura S., Ikeda T., Satoh M., Takahashi N., Sato N., Mori M., *p73: Structure and function*, Pathology International 50, 589-593 (2000)
- [34] Jayaraman L., Prives C., *Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein*, Cell. Mol. Life Sci. 55, 7-87 (1999)
- [35] Joerger A. C., Rajagopalan S., Natan E., Veprintsev D. B., Robinson C. V., et al., *Structural evolution of p53, p63, and p73: Implication for heterotetramer formation*, Proc Natl Acad Sci U.S.A 106, 17705–17710 (2009)
- [36] Kai-Hong J., Jun X., Kai-Meng H., Ying W., Hou-Qi L., *P63 expression pattern during rat epidermis morphogenesis and the role of p63 as a marker for epidermal stem cells*, Journal of Cutaneous Pathology 34, 154-159 (2007)
- [37] Kappes U. P., Luo D., Potter M., Schulmeister K., Rüniger T. M., *Short- and Long-Wave UV Light (UVB and UVA) Induce Similar Mutations in Human Skin Cells*, Journal of Investigative Dermatology 126, 667–675 (2006)
- [38] Kim E., Albrechtsen N., Deppert W., *DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53*, Oncogene 15, 857–869 (1997)
- [39] Kim S., Choi I. F., Quante J. R., Zhang L., Roop D. R., Koster M. I., *p63 directly induces expression of Alox12, a regulator of epidermal barrier formation*, Experimental Dermatology 18, 1016–1021 (2009)

- [40] de Laat A., van der Leun J. C., de Gruijl F. R., *Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose–time dependence of tumor formation in hairless mice*, *Carcinogenesis* 18, 1013–20 (1997)
- [41] Lane D. P., Crawford L. V., *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*, *Nature* 278, 261–263 (1979)
- [42] Lena A. M., Shalom-Feuerstein R., di Val Cervo P. R., Aberdam D., Knight R. A., Melino G., Candi E., *miR-203 represses ‘stemness’ by repressing DNp63*, *Cell Death and Differentiation* 15, 1187–1195 (2008)
- [43] Levrero M., Laurenzi De V., Costanzo A., Gong J., Melino G., Wang JYJ., *Structure, function and regulation of p63 and p73*, *Cell Death and Differentiation* 6, 1146–1153 (1999)
- [44] Li N., Li H., Cherukuri P., Farzan S., Harmes D. C., Di Renzo J., *TA-p63-c regulates expression of DN-p63 in a manner that is sensitive to p53*, *Oncogene* 25, 2349–2359 (2006)
- [45] Lippens S., Hoste E., Vandenabeele P., Agostinis P., Declercq W., *Cell death in the skin*, *Apoptosis* 14, 549–569 (2009)
- [46] Liu G., Nozell S., Xiao H., Chen X., *DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression*, *Mol. Cell. Biol.* 24, 487–501 (2004)
- [47] Lu Q. L., Poulsom R., Wong L., Hanby A. M., *Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues*, *J Pathol* 169, 431–437 (1993)
- [48] Malčíková J., Tichý B., Damborský J., Kabathová J., Trbušek M., Mayer J., Pospíšilová Š., *Analysis of the DNA-binding activity of p53 mutants using functional*

*protein microarrays and its relationship to transcriptional activation*, Biol. Chem. 391, 197-205 (2010)

[49] Matsui M. S., DeLeo V. A., *Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer*, Cancer Cells 3, 8–12 (1991)

[50] Matsunaga T., Hieda K., Nikaido O., *Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6–4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm*, Photochem Photobiol 54, 403–410 (1991)

[51] Mills S. E., *Histology for pathologists*, 3. vydání, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, ISBN 978-0-7817-6241-0 (2007)

[52] Minty A., Dumont X., Kaghad M., Caput D., *Covalent Modification of p73a by SUMO-1 - two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif*, The Journal Of Biological Chemistry 275, 36316-36323 (2000)

[53] Morgunková A. A., *The p53 Gene Family: Control of Cell Proliferation and Developmental Programs*, Biochemistry 70, 955-971 (2005)

[54] Murray-Zmijewski F., Lane D. P., Bourdon J.-C., *p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress*, Cell Death and differentiation 13, 962-972 (2006)

[55] Nagaich A. K., Appella E., Harrington R. E., *DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor suppressor protein p53*, J. Biol. Chem 272, 14842–14849 (1997)

- [56] Niessen C. M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*, *J Invest Dermatol* 127, 2525–2532 (2007)
- [57] Paleček E., Brázda V., Jagelská E., Pečinka P., Karlovská L., Brázdová M., *Enhancement of p53 sequence-specific binding by DNA supercoiling*, *Oncogene* 23, 2119–2127 (2004)
- [58] Paleček E., Brázdová M., Černocká H., Vlk D., Brázda V., Vojtěšek B., *Oncogene* 18, 3617–3625 (1999)
- [59] Paleček E., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 151–226 (1991)
- [60] Paleček E., Vlk D., Staňková V., Brázda V., Vojtěšek B., Hupp T. R., Schaper A., Jovin T. M., *Oncogene* 15, 2201–2209 (1997)
- [61] Papoutsaki M., Moretti F., Lanza M. et al., *A p38-dependent pathway regulates DeltaNp63 DNA binding to p53-dependent promoters in UV-induced apoptosis of keratinocytes*, *Oncogene* 24, 6970–6975 (2005)
- [62] Persson A. E., Edstrom D. W., Backvall H., Lundeberg J., Ponten F., Ros A. M. et al., *The mutagenic effect of ultraviolet-A1 on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes*, *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18, 287–93 (2002)
- [63] Petitjean A., Ruptier C., Tribollet V., Hautefeuille A., Chardon F., Cavard C., Puisieux A., Hainaut P., Caron de Fromentel C., *Properties of the six isoforms of p63: p53-like regulation in response to genotoxic stress and cross-talk with  $\Delta Np73$* , *Carcinogenesis Advance Access* (2007)

- [64] Pozniak C. D., Radinovic S., Yang A., McKeon F., Kaplan D. R., Miller F. D., *An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death*, Science 289, 304 – 306 (2000)
- [65] Reed M., Woelker B., Wang P., Wang Y., Anderson M. E., Tegtmeier P., *The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation*, Proc. Natl Acad. Sci. USA 92, 9455-9459 (1995)
- [66] Rocco J. W., Leong C. O., Kuperwasser N., DeYoung M. P., Ellisen L.W., *p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis*, Cancer Cell 9, 45–56 (2006)
- [67] Runger T. M., *Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. A short review*, Photodermatol Photoimmunol Photomed 15, 212–216 (1999)
- [68] Sancar A., *DNA repair in humans*, Annu Rev Genet 29, 69–105 (1995)
- [69] So-Young K., Hyun-Joo Ch., Dong-Seok K., Hae-Ryung Ch., Sun-Bang K., Jung-Im N., Hye-Chan J., Chang-Hoon H., Sang-Woong Y., Kwang-Hyun Ch., Kyoung-Chan P., *Differential expression of p63 isoforms in normal skin and hyperproliferative conditions*, Journal of Cutaneous Pathology 36, 825-830 (2009)
- [70] Sterenborg H. J., van der Leun J. C., *Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source*, Photochem Photobiol 51, 325–30 (1990)
- [71] Šmardová J., *Vůdčí gen p53: zpráva z konference*, Klinická onkologie 5, 238-239 (2003)



- [72] Uldrijan S., Kotala V., Vojtěšek B., *Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53*, Chem. Listy 96, 145-149 (2002)
- [73] Watson I. R., Irwin M. S., *Ubiquitin and Ubiquitin-Like Modifications of the p53 Family*, Neoplasia 8, 655-666 (2006)
- [74] Westfall M. D., Joyner A. S., Barbieri Ch. E., Livingstone M., Pietenpol J. A., *Ultraviolet Radiation Induces Phosphorylation and Ubiquitin-Mediated Degradation of  $\Delta Np63\alpha$* , Cell Cycle 4, 710-716 (2005)
- [75] World Health Organization, *Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products*, WHO Technical Report Series, 850 (1995)
- [76] Yanase H., Ando H., Horikawa M., Watanabe M., Mori T., Matsuda N., *Possible involvement of ERK 1/2 in UVA-induced melanogenesis in cultured normal human epidermal melanocytes*, Pigment Cell Res 14, 103–109 (2001)
- [77] Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A., McKeon F., Caput D., *p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours*, Nature 404, 99–103 (2000)
- [78] Ying H., Chang D. L. F., Zheng H., McKeon F., Xiao Z.-X. J., *DNA-Binding and Transactivation Activities Are Essential for TAp63 Protein Degradation*, Molecular and Cellular Biology 25, 6154-6164 (2005)
- [79] Yuan Z. M., Shioya H., Ishiko T., Sun X., Gu J., Huang Y. Y., Lu H., Kharbanda S., Weichselbaum R., Kufe D., *p73 is regulated by tyrosine kinase c-abl in the apoptotic response to DNA damage*, Nature 399, 814-817 (1999)

[80] Zotchev S. B., Protopopova M., Selivanova G., *p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core*, *Nucleic Acids Res.* 28, 4005-4012 (2000)

### **Internetové zdroje**

[81] BIODERMA – Laboratoire Dermatologique dermo-cosmétiques. *BIODERMA Laboratoire Dermatologique* [online] Bioderma. [cit. 24. března 2011] Dostupné z [www http://www.bioderma.com/cz/v-dotyku-s-vasi-pokozkou/pri-kontaktu-s-kuzi.html](http://www.bioderma.com/cz/v-dotyku-s-vasi-pokozkou/pri-kontaktu-s-kuzi.html)

[82] p53-The Guardian of Our Genome. *Medindia Networking for Health* [online] Medindia Health Network Pvt Ltd., 16. 3. 2011. [cit. 16. března 2011] Dostupné z [www http://www.medindia.net/news/view\\_news\\_main.asp?x=13078](http://www.medindia.net/news/view_news_main.asp?x=13078)

[83] Tumor protein p63 – Homo sapiens (Human). *UniProt Consortium* [online] UniProt Consortium, 2002-2011. [cit. 11. března 2011] Dostupné z [www http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H3D4](http://www.uniprot.org/uniprot/Q9H3D4)

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

A	adenin
AMK	aminokyselina
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCC	bazocelulární karcinom (basal cell carcinoma)
bp	párů bází
C	cytosin
CBP	creb binding protein
Cdk	cyklin-dependentní proteinkinasy
CON	konsensní sekvence (consensus sequence)
CREB	cAMP-response element-binding
D	delta, $\Delta$
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ds	dvouřetězcová (double stranded)
E1	enzym aktivující ubikvitin
E2	enzym přenášející ubikvitin
E3	ubikvitin ligasa
FWL	isoforma TAp63
G	guanin
G1/2	gap 1/2
HDM2	human double minute 2
kd	kilodalton
linDNA	lineární DNA
lys	lysin
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MDM2	mouse double minute 2
miR	microRNA
NER	nucleotide excision repair system
NMSC	nemelanomové nádory (non-melanoma skin cancer)
ocDNA	otevřená kružnicová forma DNA
P	prolin
PERP	p53 effector related to PMP-22
Pu	purinová báze (A, G)
RNA	ribonukleová kyselina
Py	pyrimidinová báze (T, C)
RE	responsive elements
S	syntéza (synthesis)
SAM	sterile alpha motiv
SCC	spinocelulární karcinom (squamous cell carcinoma)
scDNA	superhelikální DNA (supercoiled)
SCS	superhelikálně-selektivní vazba DNA (supercoil-selective DNA binding)
SSDB	sekvenčně specifická DNA vazba (sequence specific DNA binding)
ssDNA	jednořetězcová DNA (single stranded)
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SV40	Simian vacuolating virus 40
UV	ultrafialové (ultraviolet)
UVA	dlouhovlnné ultrafialové záření
UVB	středněvlnné ultrafialové záření
T	thymín
TA	transaktivační

Thr      threonin  
Tyr      tyrosin  
wt      wild type  
8-oxo-G 7,8-dihydro-8-oxoguaninu

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Funkční domény proteinu p53 (převzato z Bode, 2004).....	12
Obr. 2 - Isoformy proteinu p53 (převzato z Murray-Zmijewski et al., 2006) .....	13
Obr. 3 - Regulace proteinu p53 (převzato z Uldrijan et al., 2002) .....	14
Obr. 4 - Acetylace p53 (převzato z Bode and Dong, 2004).....	16
Obr. 5 - Fosforylace p53 (převzato z Bode and Dong, 2004).....	17
Obr. 6 - Model interakce C-konce p53 s dvouvláknovou scDNA (převzato z Brázdová et al., 2002) .....	21
Obr. 7 – Lidský p63 (převzato z Murray-Zmijewski et al., 2006).....	24
Obr. 8 – Zpětnovazebný model degradace TAp63 $\alpha$ (převzato z Ying et al., 2005).....	26
Obr. 9 – Diagram genů regulovaných TAp63 $\alpha$ nebo $\Delta$ Np63 $\alpha$ isoforem v Tet-indukovatelných Saos-2 buňkách (převzato z Candi et al., 2006).....	27
Obr. 10 – Srovnání genové struktury a funkční organizace členů rodiny p53 (převzato z Bénard et al., 2003) .....	30
Obr. 11 – Schéma pochodů členů rodiny p53 (převzato z Bénard et al., 2003) .....	32
Obr. 12 - a) Struktura lidského genu p73, b) Isoformy p73 (převzato z Murray-Zmijewski et al., 2006) .....	34
Obr. 13 – Lidská kůže (upraveno z webové stránky Bioderma) .....	35
Obr. 14 – Vzorek č. 5, p63 KN $\Delta$ .....	48
Obr. 15 - Vzorek č. 5, p63 KN $\Delta$ TA .....	49
Obr. 16 - Vzorek č. 28, p63 KN $\Delta$ .....	50
Obr. 17 – Vzorek č. 28, p63 KN $\Delta$ TA.....	51
Obr. 18 – Vzorek č. 28, p63 KN $\alpha$ .....	52

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1 - Nejdůležitější nádorové supresory .....	9
Tab. 2 – Regulátory p53 (upr. Bode & Dong, 2004; Bénard et al., 2003; Du et al., 2009; Uldrijan et al., 2002) .....	18
Tab. 3 – Doba inkubace v DAB.....	44
Tab. 4 – Výsledky exprese p63.....	46