

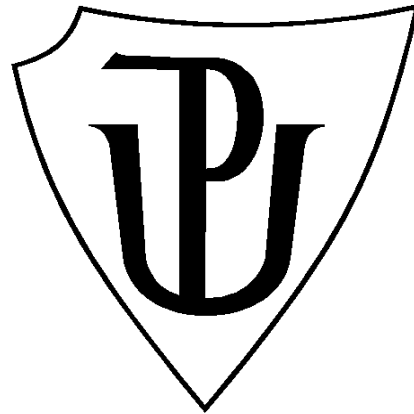
**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2017**

**Lucie Řeháková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Mutační analýza genu TP53 u vybraných  
hematologických malignit**

**Bakalářská práce**

**Lucie Řeháková**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2017**

**Vedoucí práce: Mgr. Lenka Křupková, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Mgr. Lenky Křupkové, Ph.D. Veškeré zdroje uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 05. 05. 2017

---

Lucie Řeháková

## **SOUHRN**

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou genu TP53, který se na základě svých vlastností řadí mezi tumor supresorové geny. Na proteinové úrovni kóduje transkripční faktor p53, který má v buňce především funkci senzoru poškození DNA. Po aktivaci protein p53 spouští ochranné mechanismy, nejčastěji ve formě zástavy buněčného cyklu, DNA-opravných mechanismů, případně indukuje buněčnou smrt.

Mutace nádorového supresorového genu TP53 často korelují s patogenezí hematologických malignit, proto představují významný prognostický faktor těchto onemocnění.

Teoretická část práce pojednává o základních vlastnostech genu TP53 a proteinu p53, jejich struktuře, funkci a regulaci. Následuje stručný popis jejich role u hematologických malignit se zaměřením na myelodysplastický syndrom (MDS) a chronickou lymfocytární leukemii (CLL).

V rámci praktické části byla pomocí přímého Sangerova sekvenování provedena mutační analýza vybraných exonů genu TP53 u skupiny deseti pacientů s MDS nebo CLL. Získané výsledky mají přímý vliv na prognostickou stratifikaci nemocných a napomáhají ve volbě ideální léčebné strategie.

## **SUMMARY**

This bachelor thesis is focused on the characterization of the TP53 gene, which is based on its characteristics among tumor suppressor genes. TP53 gene encodes transcription factor p53 at the protein level, p53 has primarily a function of the sensor of DNA damage in a cell. Protein p53 initiates the protective mechanisms after its activation, mostly in the form of cell cycle arrest, DNA repair mechanisms or induces cell death.

Mutations of TP53 gene often correlate with the pathogenesis of hematological malignancies, therefore, they are an important prognostic factor in these diseases.

The theoretical part discusses the basic properties of the TP53 gene and protein p53, their structure, function and regulation. Then follows a brief description of their role in hematologic malignancies, focusing on myelodysplastic syndrome (MDS) and chronic lymphocytic leukemia (CLL).

In the practical part, the mutational analysis of selected exons of the TP53 gene was performed by direct Sanger sequencing method in the group of ten patients with MDS or CLL. The results have a direct impact on the prognostic stratification of the patients and they assist in choosing the ideal treatment strategy.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Největší díky patří především mé školitelce Mgr. Lence Křupkové, Ph.D. za cenné rady a věcné připomínky, poskytnuté studijní materiály, vlídný a laskavý přístup, trpělivost a ochotu, věnovaný čas, nedocenitelnou pomoc v průběhu zpracování bakalářské práce a za její vstřícnost během jednotlivých konzultací.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnuté rady a ochotu pomoci během praktické části této práce.

Velký dík patří také mojí rodině za zázemí a podporu během celého studia, poslední díky patří přátelům.

# OBSAH

1 ÚVOD .....	7
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	8
2.1 Gen TP53.....	8
2.1.1 Struktura genu TP53 a charakteristika proteinu p53 .....	9
2.1.2 Funkce proteinu p53 a jeho regulace .....	11
2.1.3 Mutace genu TP53 .....	15
2.2 Role mutací TP53 u vybraných hematologických malignit.....	20
2.2.1 B-buněčná chronická lymfocytární leukémie .....	21
2.2.2 Myelodysplastický syndrom (MDS).....	22
3 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE .....	25
4 MATERIÁL A METODIKA.....	26
4.1 Biologický materiál.....	26
4.2 Přístrojová technika.....	26
4.3 Chemikálie a spotřební materiál .....	27
4.4 Přehled metod – teorie .....	27
4.5 Pracovní postupy.....	31
4.5.1 Separace mononukleární frakce buněk (MNC) .....	31
4.5.2 Izolace DNA.....	31
4.5.3 Spektrofotometrické měření koncentrace DNA na NanoDropu....	32
4.5.4 PCR .....	32
4.5.5 Elektroforetická detekce PCR produktu .....	33
4.5.6 Extrakce PCR produktu z gelu.....	33
4.5.7 Sekvenační reakce.....	34
4.5.8 Přečištění produktu sekvenační reakce .....	34
4.5.9 Vlastní sekvenování – kapilární elektroforéza.....	35
5 VÝSLEDKY .....	36
6 DISKUZE.....	42
7 ZÁVĚR.....	44
8 POUŽITÁ LITERATURA.....	45
9 SEZNAM ZKRATEK.....	52
10 PŘÍLOHY.....	54

## 1 ÚVOD

Kancerogeneze je vícestupňový proces, během kterého dochází k postupné akumulaci genetických a epigenetických změn, které mají za následek přeměnu normální buňky v buňku nádorovou. Riziko přeměny normální buňky v buňku nádorovou je značně vyšší, pokud má buňka sníženou schopnost udržování stability genomu.

TP53 je tumor supresorový gen, který zajišťuje ochranu a stabilitu lidského genomu. Gen TP53 kóduje DNA vazebný fosfoprotein p53, který funguje jako transkripční faktor, podílející se na opravě DNA, zastavení buněčného cyklu a programované buněčné smrti. Pokud v genu TP53 vznikne mutace, dochází k narušení funkce proteinu p53. Jeho inaktivace mutací je častá v průběhu maligní transformace buněk u některých solidních nádorů i hematologických malignit.

Mutační analýza genu TP53 u hematologických malignit má zejména prognostický význam. Pacienti nesoucí mutaci TP53 vykazují výrazně horší prognózu, vyšší pravděpodobnost progresu do symptomatického onemocnění, špatnou a kratší odpověď na chemoimunoterapeutickou léčbu. Medián přežití těchto pacientů od doby zahájení léčby je méně než tři roky. V současné době je mutace nebo delece TP53 jediná genetická abnormalita, ovlivňující výběr léčebného postupu a současně předpovídající odpověď na tuto léčbu u chronické lymfocytární leukémie.

Hlavní náplní mé bakalářské práce byla analýza mutací genu TP53 v exonech 5–8, ve vzorku DNA izolované z mononukleární frakce buněk periferní krve či kostní dřeně u souboru 10 pacientů postižených myelodysplastickým syndromem (MDS) nebo B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií (B-CLL). Mutace genu TP53 byly detekovány pomocí metody přímého Sangerova sekvenování.

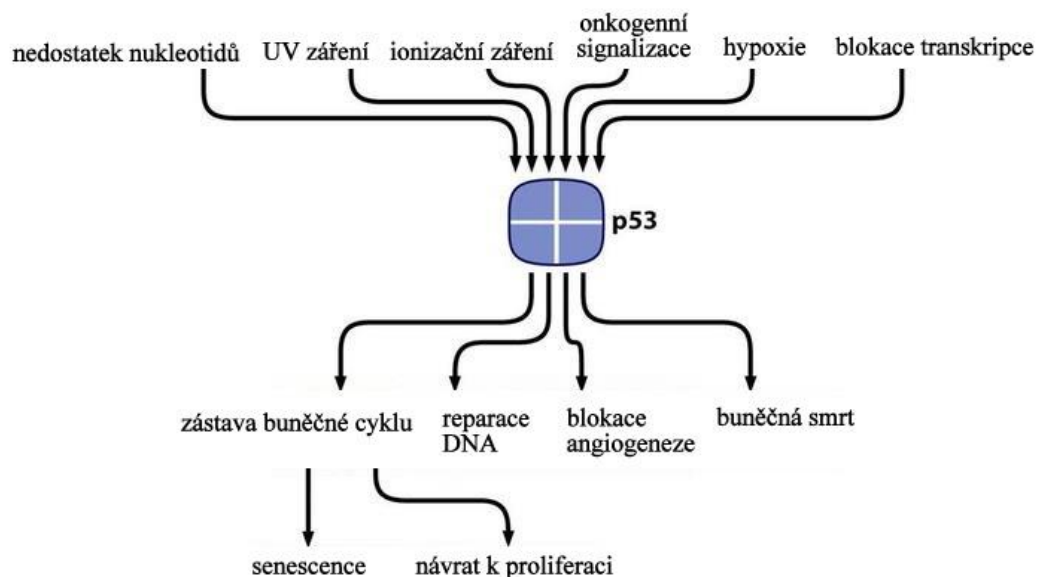


## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Gen TP53

Gen TP53 je tumor supresorový gen vyskytující se ve všech jaderných buňkách v lidském těle (Bates et al., 1999). V současné době se řadí mezi nejvíce studované nádorové supresory (Klener, 2002).

Tumor supresorové geny jsou zodpovědné za ochranu a stabilitu lidského genomu, neboť jimi kódované proteiny se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů (Obr. 1). Svou funkcí zásadně ovlivňují transkripci, opravy DNA, změny metabolismu buňky, řízení buněčného cyklu a programovanou buněčnou smrt – apoptózu (Loyo et al., 2013).



Obr. 1: **Způsoby ochrany genomu zajištěné proteinem p53.** Protein p53 je aktivován celou řadou vnitřních i vnějších stresových signálů a je zodpovědný za indukcii buněčné odpovědi, zahrnující zejména zástavu buněčného cyklu, opravu DNA a apoptózu.

(Zdroj: <http://www.proprofs.com/flashcards/story.php?title=cancer-biol465-lectures-56>; upraveno)

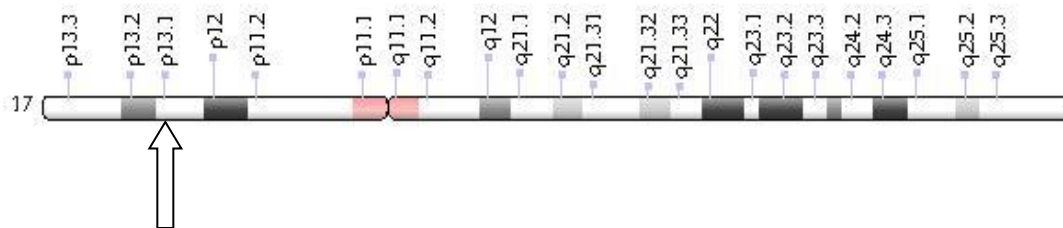
Gen TP53 patří z hlediska evoluce mezi staré geny, nachází se v mnoha významných skupinách obratlovců. Ve všech organismech, kde byl doposud identifikován, jeví podobnou organizaci. Produktem genu TP53 je protein p53. V sekvenci nukleotidů genu TP53 se nachází pět evolučně konzervovaných domén, které jsou důležité pro

protinádorovou aktivitu (Genetics Home Reference). Shodnost těchto pěti domén dosahuje téměř 100 % u všech popsanych proteinů p53 (Friedman et al., 1993).

### 2.1.1 Struktura genu TP53 a charakteristika proteinu p53

Lidský gen TP53 je lokalizován na krátkém raménku 17. chromozomu, konkrétně v oblasti 13.1 (Obr. 2) (Seifert et al., 2009). Skládá se z 11 exonů (první z exonů je však nekódující), 10 intronů a jeho celková délka činí 20 kb (Loyo et al., 2013).

Gen TP53 kóduje jaderný fosfoprotein p53 (Lamb et al., 1986). Označení p53 vychází z molekulové hmotnosti proteinu, která má hodnotu 53 kDa (Levine et al., 2009).



Obr. 2: **Lokalizace genu TP53 na 17. chromozomu.** Šipka značí konkrétní oblast 13.1, kde je gen TP53 lokalizován.

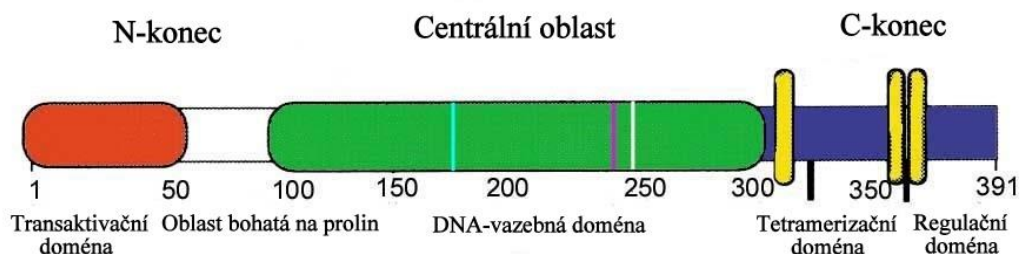
(Zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>)

Protein p53 se jako důležitý nádorový supresor, podílí se na ochraně buňky před onkogenní transformací (Rivlin et al., 2011). Byl objeven již v roce 1979 jako jeden z prvních tumor-supresorů (Ahuja et al., 2005), avšak díky jeho vysoké expresi v nádorových tkáních byl původně považován za onkogen (Solomon, 2010).

Od doby svého objevu je protein p53 intenzivně zkoumán, v roce 1993 dokonce získal označení molekula roku (Koshland, 1993). Intenzivní studia probíhají zejména z toho důvodu, že se různé typy mutací v genu TP53 vyskytují u více než 50 % lidských nádorů (Olivier et al., 2010) a že, protein p53 má klíčovou úlohu v regulaci základních procesů buňky – v buněčném cyklu, apoptóze a genomové stabilitě (Shaw, 1996).

Protein p53 je DNA vazebný fosfoprotein, jehož monomerní jednotka je tvořena 393 aminokyselinami (Bronchud et al., 2004). Za fyziologických podmínek je v buňkách jeho koncentrace nízká, neboť dochází k neustálé degradaci. Naopak při působení stresových faktorů dochází v buňce ke stabilizaci p53 a nárůstu jeho koncentrace (Hamzehloile et al., 2012).

Struktura p53 je tvořena třemi funkčními oblastmi (Obr. 3): N-koncová oblast, centrální oblast a C-koncová oblast. Právě N-koncové a C-koncové oblasti jsou místem posttranslačních úprav samotného proteinu, jakými jsou například fosforylace a acetylace (Nathan et al., 2011).



Obr. 3: **Hlavní domény proteinu p53.** Základ struktury monomerní jednotky tvoří 3 domény: N-koncová, centrální a C-koncová doména.

(Zdroj: [http://www.umass.edu/microbio/chime/beta/consurf3/dec19/my\\_molecule/pipes/mypipes/introduction.htm](http://www.umass.edu/microbio/chime/beta/consurf3/dec19/my_molecule/pipes/mypipes/introduction.htm); upraveno)

### N-koncová oblast

N-koncová oblast zajišťuje interakce s proteiny, ovlivňujícími navázání p53 na DNA. V N-koncové oblasti se nachází dvě transkripčně aktivační domény (Trans activation domain – TAD1, TAD2) a doména bohatá na prolin (Proline rich domain – PRD).

V transkripčně aktivační doméně se nachází vazebné místo proteinu MDM2, který je hlavním negativním regulátorem p53 (Liu et al., 2003). Dále se na transkripčně aktivační doménu váží transkripční faktory TAF<sub>II</sub>40 a TAF<sub>II</sub>60, vazebný protein TATA, acetyltransferázy a mnoho dalších buněčných a virových proteinů (Thut et al., 1995; Reed et al., 2015).

Oblast bohatá na prolin je nezbytná pro transkripční aktivaci cílových genů proteinu p53. Právě tato doména ovlivňuje funkci p53 a reguluje jeho stabilitu, čímž má přímý vliv na regulaci programované buněčné smrti (Beckerman et al., 2010). Současně se na tuto doménu váže i protein iASPP (inhibitory apoptosis stimulating protein p53), který má na apoptózu inhibiční účinky (Notari et al., 2011).

N-konec často podléhá post-translačním modifikacím, například jeho fosforylace je klíčová pro stabilitu proteinu a transkripci cílových genů (Xu, 2003).

## **Centrální oblast**

Centrální oblast, neboli DNA vazebná doména, se skládá ze čtyř konzervativních domén. Právě DNA vazebná doména je zodpovědná za sekvenčně specifickou vazbu na promotory genů regulovaných proteinem p53 (Pavletich et al., 1993) a má klíčový význam na stabilitu celé struktury proteinu p53. Základem této oblasti je sendvič dvou  $\beta$ -listů, které jsou k sobě vzájemně antiparalelní (Olivier et al., 2010).

Centrální část je značně nestabilní, neboť denaturuje již při teplotě nepatrně vyšší, než je tělesná teplota. Při teplotě 37 °C nastává změna, při které dojde k rychlému rozvolnění konformace domény do rozbaleného stavu (Chan et al., 2004). To je také důvod, proč se nejvíce mutací nachází právě v této oblasti (Cino et al., 2016).

Až 90 % doposud popsanych mutací u proteinu p53 je lokalizováno právě v DNA vazebné doméně p53. Nejčastěji se jedná o bodové mutace, které mohou částečně nebo úplně narušovat vazbu p53 na cílovou DNA, a tím blokovat jeho funkci transkripčního faktoru (Végran et al., 2013).

Součástí DNA-vazebné domény je i atom zinku, jehož přítomnost je nutná pro vazbu na DNA. Na DNA se p53 váže ve formě tetrameru, tvořeného dvěma identickými dimery, které jsou provázané protein-proteinovými vazbami. Mezi tyto vazby patří polární vazby, vodíkové můstky a hydrofobní interakce (Cino et al., 2016).

## **C-koncová oblast**

C-koncová oblast se skládá z oblasti bohaté na prolin, která umožňuje propojení s centrální oblastí. Dále je pak tvořena negativní autoregulační a tetramerizační doménou. Tetramerizační doména zodpovídá za tetramerní uspořádání proteinu p53 během vazby na DNA. Negativní autoregulační doména zodpovídá za nespecifickou vazbu DNA, v důsledku čehož dochází k allosterické inhibici proteinu. Mutace v této oblasti mají za následek zvýšení transaktivačních vlastností a proteinové stability (Stavridi et al., 2005).

### **2.1.2 Funkce proteinu p53 a jeho regulace**

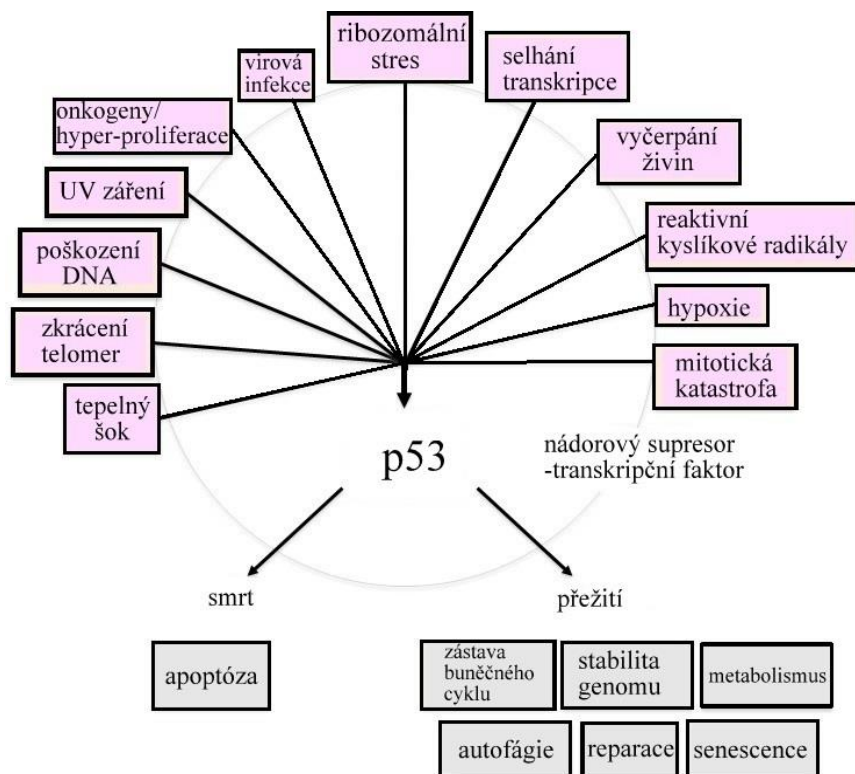
Úlohou proteinu p53 je především ochrana buněk před možnou přeměnou na buňky nádorové. Mezi hlavní funkce proteinu p53 patří kontrola intaktnosti DNA v průběhu mnoha buněčných procesů, např. buněčného cyklu, diferenciaci, stárnutí a programované

buněčné smrti. Pro tyto důležité vlastnosti bývá také často nazýván „strážcem genomu“ (Efeyan et al., 2007).

Při normálních fyziologických podmínkách se protein nachází v buňce v inaktivovaném stavu a nízké koncentraci (Ashcroft et al., 1999), neboť dochází k jeho neustálé degradaci – poločas jeho rozpadu se pohybuje v rozmezí 6 až 20 minut (Davis, 2013).

### Aktivace proteinu p53

Reakcí na stresové signály, ať už přicházející z vnějšího či vnitřního prostředí (Obr. 4), je protein p53 aktivován (Horn et al., 2007). Signály spouštějící aktivitu p53 jsou různorodé: hypoxie, kritické zkrácení telomer, poškození DNA (Lakin et al., 1999; Calado et al., 2012; Lodish et al., 2000).



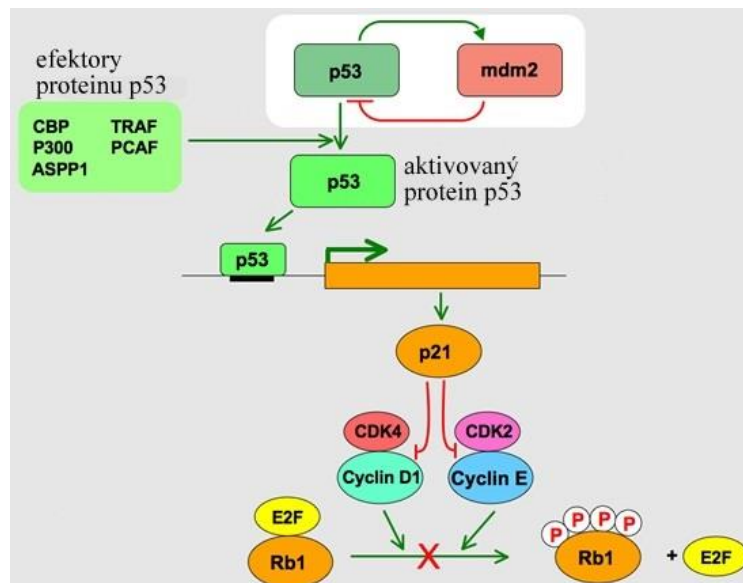
Obr. 4: **Stresové podněty vedoucí k aktivaci p53.** Široké spektrum stresových podnětů se podílí na aktivaci p53. Aktivace p53 vede ke koordinovaným změnám v genové expresi a odlišným reakcím závislým na typu buněk a intenzitě trvání stresových signálů.

(Zdroj: Loughery et al., 2013; upraveno)

Jsou známy tři způsoby aktivace p53: aktivace umožněná interakcí s p14<sup>ARF</sup>, aktivace způsobená negenetickými faktory a aktivace po poškození DNA (Lowe, 1999; Vogelstein et al., 2000). Po detekci poškození DNA dochází k fosforylaci vazebného místa pro negativní regulátor MDM2, čímž je znemožněna tvorba komplexu p53-MDM2 a p53 je tímto aktivován.

Stabilizace a aktivace p53 indukuje expresi inhibitoru buněčného cyklu p21. Protein p21 inhibuje cyklin-dependentní kinázy 2, 4 a 6, které řídí průchod buňky kontrolními body buněčného cyklu v G1 fázi. Právě inhibice cyklin-dependentních kináz zabrání fosforylaci Rb proteinů, což má za následek zastavení buňky v G1 fázi. Aktivita Rb proteinů je řízena fosforylací. Pokud jsou Rb proteiny hypofosforylované, dochází k inhibici exprese genů, které jsou nezbytné pro vstup buňky do S-fáze. Proteiny Rb naváží E2F transkripční faktor, který se tímto stává neúčinný, a to je způsob, jakým je exprese genů, nutných pro vstup buňky do S-fáze, inhibována (Obr. 5).

Pro správný průchod G1 fázi buněčného cyklu je nezbytná fosforylace proteinu Rb pomocí komplexů cyklinů s cyklin-dependentními kinázami. Protein p53 zastaví buněčný cyklus tím, že prostřednictvím p21<sup>cip</sup> inhibuje fosforylaci Rb proteinů. Jestliže samotná buňka v této fázi již nezvládne opravit poškození DNA, pak protein p53 indukuje apoptózu. Zástava buněčného cyklu v kontrolním bodě G1 je spojena s degradací cyklinu D, v důsledku této degradace dojde k uvolnění p21<sup>cip</sup> z CKD4 (Falck et al., 2001; Garrett et al., 2001; Israels et al., 2001).



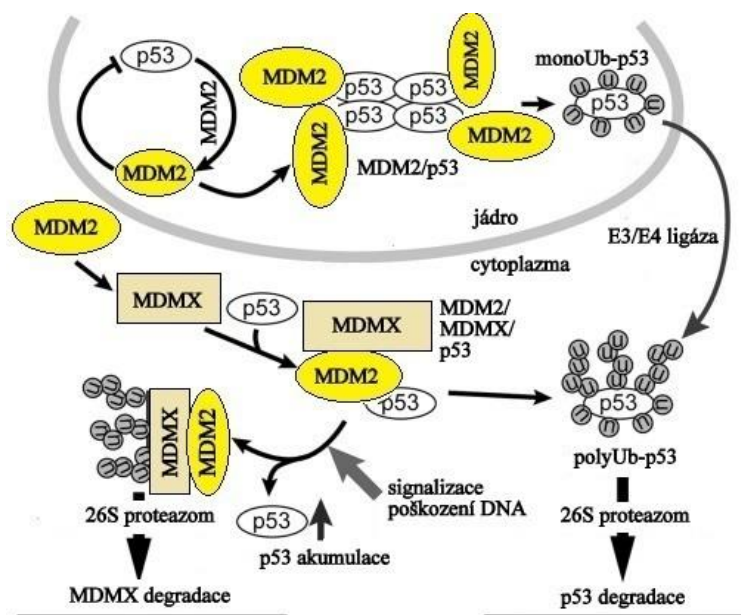
Obr. 5: **Signalizace proteinu p53.** Inaktivní protein p53 je v cytoplazmě navázán na přenašeč MDM2. V případě poškození DNA se spustí signální kaskáda, která fosforyluje MDM2 a uvolní protein p53, který se tímto stává aktivní. Aktivní p53 v jádře indukuje expresi inhibitoru buněčného cyklu, proteinu p21. Protein p21 svou vazbou inhibuje komplexy CDK4/cyklin D1 a CDK2/cyklin E, které dále nemohou fosforylovat protein Rb a dochází k zástavě buněčného cyklu.

(Zdroj: [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_Pathways.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html); upraveno)

### Regulace proteinu p53

Regulace aktivity p53 je nezbytná pro normální růst a vývoj buněk (Li et al., 2007). Protein p53 je významným inhibitorem proliferace buněk (Serrano et al., 1997) a jeho regulace může v buňce probíhat na úrovni transkripce, translace, pomocí kovalentních i nekovalentních modifikací a konformačních změn (Ashcroft et al., 1999). Lidský protein p53 je nejméně na 18 místech posttranslačně modifikován (Appella et al., 2001). Kontrola stability p53 je klíčovým mechanismem jeho regulace (Ashcroft et al., 1999).

Kvůli důležité roli p53 v buňce je nutná jeho přesná regulace (Brooks et al., 2011). Klíčovou úlohu během regulace p53 hraje protein MDM2, jehož exprese je indukována přímo samotným p53. Protein MDM2 funguje jako ubikvitin-ligáza a je zodpovědný za udržování nízké hladiny p53 v buňce za fyziologických podmínek prostřednictvím ubikvitin-závislé degradace v proteazomu (Obr. 6), (Moll et al., 2003; O'Keefe et al., 2003; Shi et al., 2012).



Obr. 6: **Proces degradace p53.** MDM2 indukuje ubikvitinylaci p53. Ubikvitinylovaný p53 je transportován z jádra do cytoplazmy, kde je degradován v proteazomu 26S. Toho procesu se také účastní protein MDMX, strukturní homolog proteinu MDM2, jehož aktivita není proteinem p53 regulována.

(Zdroj: Chao, 2015; upraveno)

### 2.1.3 Mutace genu TP53

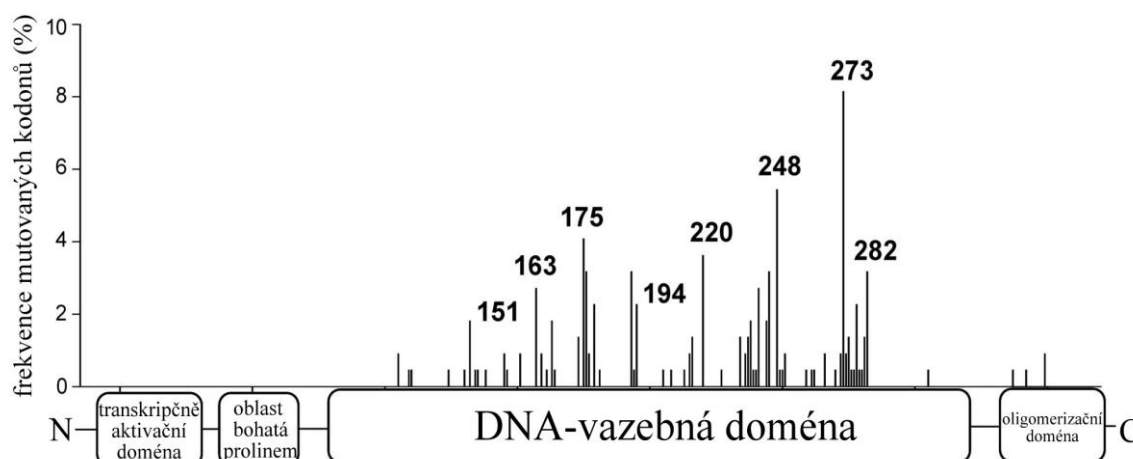
Mutace TP53 byla poprvé nalezena v roce 1989 u karcinomu tlustého střeva (Baker et al. 1989). Přičemž až doposud je nejvíce mutací lokalizováno v centrální doméně proteinu (Obr. 7), kde zapříčiňují ztrátu schopnosti vázat se na cílovou DNA. Přímou v centrální doméně proteinu se nachází šest míst, kde je frekvence mutací nejvyšší. Tato místa se nazývají mutační „hot spoty“. Mezi „hot spot“ mutace řadíme například substituce argininu na pozicích 175, 243, 273 a 282. „Hot spot“ mutace tvoří okolo 20 % všech mutací (Rivlin et al., 2011). Naopak daleko méně se mutace vyskytují v N-terminálních a C-terminálních doménách (Pavletich et al., 1993).

Četnost somatických mutací TP53 závisí na konkrétním typu daného nádoru (Rivlin et al., 2011). Nejvyšší četnost mutací se nachází u kožních nádorů (kromě melanomů) (Benjamin et al., 2008), dále pak u nádorů močového měchýře – hlavně v pozdních stádiích (Berggren et al., 2001).

V současné době se většina doposud objevených mutací vyskytuje v 5.–8. exonu, konkrétně v oblasti DNA-vazebné domény (Végran et al., 2003). Mutace TP53 mají na



rozdíl od většiny nádorových supresorů zcela odlišnou inaktivací. Zatímco inaktivace u jiných nádorových supresorů zapříčiňuje syntézu proteinu v nekompletní podobě nebo celkovou ztrátu proteinu, inaktivace proteinu p53 má nejčastěji charakter bodových mutací v kódující sekvenci (Strano et al., 2007). Konkrétně mezi nejčastější mutace TP53 patří substituce ztrátového typu, kdy vlivem zařazení odlišného nukleotidu dojde ke změně tripletu, translací se přiřadí odlišná aminokyselina, a tím i změně funkce polypeptidu (Campomenosi et al., 2011).



Obr. 7: **Mutace inaktivující p53 a jejich četnost.** Struktura genu TP53 a četnost mutací na jednotlivých kodonech. Histogram mutací ukazuje, nejvíce mutací se vyskytuje v oblasti DNA-vazebné domény.

(Zdroj: Brachova et al., 2015; upraveno)

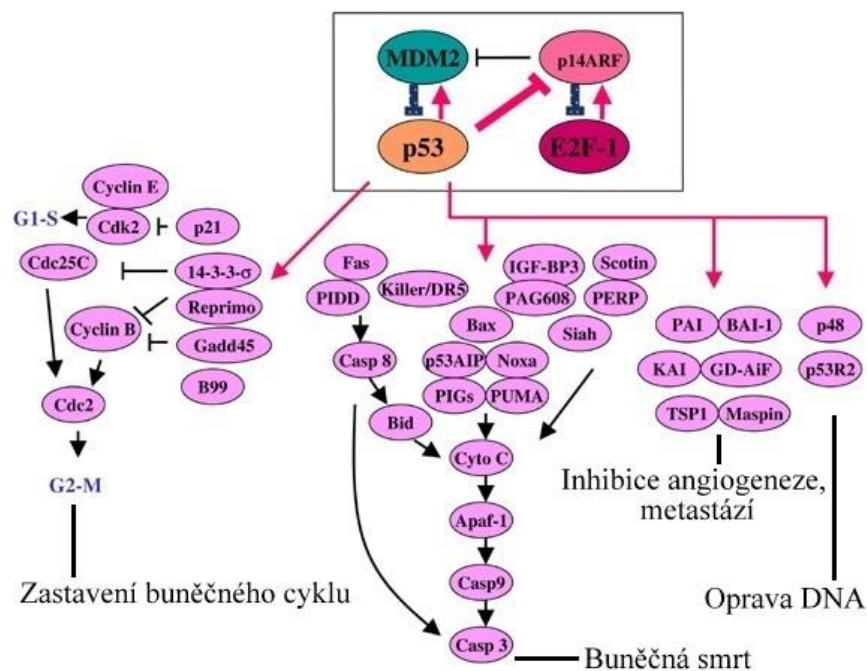
Mutace vyskytující se v centrální doméně je možné rozdělit do dvou kategorií. Do první kategorie spadají mutace, které ovlivňují aminokyseliny účastnící se vazby na DNA. Řadíme sem mutované zbytky p53 s nejvyšší frekvencí mutací (Arg-248 a Arg-273). Do druhé kategorie spadají mutace vyskytující se v oblastech významných z hlediska konformační stability (Bykov et al., 2009).

Mutace genu TP53 kódujícího protein p53 byly nalezeny u více než 50 % pacientů s onkologickým onemocněním (Joerger et al., 2007). K roku 2007 bylo popsáno okolo 30 000 mutací genu TP53 (Petitjean et al., 2007). Vliv na částečnou nebo celkovou dysfunkci proteinu p53 může mít i porucha některé jeho signální dráhy. Buňky s nefunkčním proteinem p53, připívají k horšímu vývoji onemocnění, neboť nemohou dostatečně zajistit opravy DNA (Tandom et al., 2010). Mutovaný p53 v nádorech zapříčiňuje jejich vyšší agresivitu a rezistenci vůči chemoterapeutické léčbě (Oren et al., 2010). Četnost mutací je odlišná, závisí na konkrétním druhu nádorového onemocnění,

u hematologických malignit činí zhruba 14 %, což je nižší hodnota, než vykazují jiná nádorová onemocnění (Newcomb, 1995).

Protein p53 podléhající mutacím může mít fenotyp „gain of function“. U tohoto fenotypu dojde k zisku onkogenních vlastností, které v buňkách zvyšují nádorový potenciál a tím i citlivost nádorů k chemoterapeutikům. U pacientů, kteří mají „gain of function“ mutaci p53 je odolnost vůči chemoterapii vyšší, než u pacientů, jimž p53 zcela chybí. Dalším typem fenotypu může být „loss of function“, jehož projevem je ztráta schopnosti vazby na promotor cílových genů a jejich regulace. Pro správné působení proteinu p53 je nezbytný jeho výskyt v jádře, v některých nádorech je inaktivace p53 způsobena tím, že je místo v jádře lokalizován v cytoplazmě (Oren et al., 2010).

Kromě mutací může být inaktivace proteinu p53 zapříčiněna nadměrnou degradací prostřednictvím proteinu MDM2. Z důvodu rozsáhlého působení proteinu p53 je nutná jeho bezchybná funkce. Působí totiž jako transkripční faktor, který indukuje expresi desítek cílových genů (Obr. 8). Tyto cílové geny tvoří komplexní síť, tudíž aktivita proteinu p53 se promítá do velkého počtu procesů na buněčné úrovni (Moll et al., 2003).



Obr. 8: **Geny aktivované proteinem p53.** Protein p53 funguje jako transkripční faktor indukující expresi velkého počtu cílových genů. Cílové geny proteinu p53 umožňují různé biologické procesy a spouští programy vedoucí k zástavě buněčného cyklu, buněčné smrti, inhibici angiogeneze nebo opravě DNA.

(Zdroj: Harris et al., 2005; upraveno)

Během poškození DNA dojde ke zvýšení hladiny proteinu p53, což má za následek zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. Následuje reparace poškozené DNA nebo indukce apoptózy, vše závisí na fyziologickém stavu buňky. Většina mutací deaktivujících p53 má za následek ztrátu schopnosti proteinu vázat se k jeho cílovým DNA sekvencím, a zabrání tak transkripční aktivaci příslušných genů (Sionov et al., 2013). Pro narušení funkce nádorového supresoru p53 je nejčastěji zapotřebí inaktivace obou alel. V některých vzácných případech se mutace TP53 mohou vyskytovat i v zárodečných buňkách, v důsledku čehož se přenášejí do další generace (Kim et al., 2015).

Na specifické sekvence DNA v promotorových oblastech cílových genů se p53 váže ve formě tetrameru (McLure et al., 2015). Produkty cílových genů proteinu p53 mají vliv na mnoho buněčných procesů spjatých s nádorovou transformací. Jestliže protein p53 ztratí svou funkci, dojde k deregulaci podřízených signálních drah a k posunu buňky k nádorovému fenotypu (Rivlin et al., 2011).

### **Teplotně závislé mutace**

Teplotně závislé mutace tvoří okolo 10 % všech známých mutací p53. Protein p53 nesoucí teplotně závislou mutaci se není schopen za fyziologických podmínek vázat na DNA sekvence cílových genů, ale k obnově schopnosti vazby dochází právě změnou teploty. Teplotně závislé mutace představují bodové mutace v DNA-vazebné doméně, vedou ke ztrátě funkce nádorového supresoru p53, ale také obvykle mění transkripční vlastnosti proteinu p53, přičemž ovlivňují aktivaci jiných genů, podporujících nádorový růst (Butler et al., 2005).

V závislosti na charakteru rozlišujeme dva typy teplotně závislých mutací. Prvním typem jsou teplotně citlivé mutace, u těchto mutací se zvyšující se teplotou aktivita proteinu p53 s mutací klesá. Druhý typ představují chladově citlivé mutace, kde aktivita proteinu p53 s mutací se zvyšující se teplotou stoupá (Zhang et al., 1994). Výzkum teplotně závislých mutací je důležitý z hlediska schopnosti cílené terapie při obnovení funkce aktivace p53 (Parrales et al., 2015).

### **Mutace p53 a změny ve struktuře chromozomů**

V buňkách u hematologických malignit se včetně aberace charakteristické pro konkrétní typ onemocnění často nachází i přestavby chromozomů, zahrnující i změny chromozomu 17, kde se p53 vyskytuje (Zedan et al., 2015).

V případě ztráty celého chromozomu 17 či jeho zlomu v oblasti s p53 může dojít k projevu efektu bodové mutace přítomné ve druhé alele, v důsledku čehož nádorový supresor zcela ztratí svůj význam – tato situace je nazývána ztrátou heterozygotnosti (Shetzer et al., 2014).

### **Hematologické malignity**

Hematologické malignity jsou nádorová onemocnění postihující lymfatické uzliny a kostní dřeň. Onemocnění je dáno přeměnou zdravé buňky na klon maligních buněk, následně infiltrujících nejčastěji lymfatické uzliny nebo kostní dřeň.

Postupnou akumulací genetických a epigenetických změn dochází k nádorové transformaci buňky – nádorové buňky nekontrolovatelně proliferují, jsou rezistentní k pro-apoptotickým signálům, a získávají schopnost migrace a metastázování (Chen et al., 2013) Hematologické malignity klasifikujeme na základě kmenové buňky, ze které vychází (Jones et al., 2008), další možnost klasifikace je na základě klinických příznaků (Tab. 1).

**Akutní leukémie**

Akutní lymfoblastové leukémie  
Akutní myeloblastové leukémie

---

**Chronické leukémie**

Chronická lymfocytová leukémie  
Prolymfocytová leukémie  
Leukémie s vlasatými buňkami

---

**Myelodysplastické syndromy**

Refrakterní anémie  
Refrakterní anémie s excesem blastů  
Refrakterní anémie s excesem blastů v transformaci  
Refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty  
Chronická myelomonocytová leukémie

---

**Chronická myeloidní leukémie a neleukemické myeloproliferační choroby**

Chronická myeloidní leukémie  
Pravá polycytémie  
Primární trombocytémie  
Myelofibróza s myeloidní metaplazií

---

**Maligní lymfomy**

Hodgkinovy lymfomy  
Nehodgkinské lymfomy

---

**Imunoproliferační onemocnění – onemocnění plasmatické buňky a příbuzné choroby**

Plazmocytom – mnohočetný myelom  
Doutnající myelom  
Monoklonální gamapatie  
Waldenströmova makroglobulinemie

Tabulka 1: **Dělení hematologických malignit.**

(Zdroj: MÍRKA, Hynek. *Možnosti výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností v diagnostice plicních komplikací hematoonkologických onemocnění*. Plzeň, 2006. Doktorandská dizertační práce. Lékařská fakulta UK v Plzni. Fakulta lékařská.)

## 2.2 Role mutací TP53 u vybraných hematologických malignit

V porovnání se solidními nádory je frekvence mutací TP53 u hematologických malignit mnohem nižší (Cheung et al., 2009). Výskyt mutací TP53 je mezi jednotlivými maligními lymfoproliferacemi velmi odlišný, závisí především na histologickém subtypu a stádiu onemocnění. U leukémií se frekvence mutací genu TP53 pohybuje v rozmezí 5 – 20 % (Takahashi et al., 2016).

Mutace TP53 je téměř vždy spjata s horší prognózou onemocnění, progresí onemocnění do další fáze (např. myelodysplastický syndrom se může vyvinout do akutní myeloidní leukémie), četnějšími transformacemi, rezistencí vůči chemoterapii a kratší délkou celkového přežití (Newcomb, 1995). Důležité je také zmínit, že mutace TP53 se více vyskytují u starších pacientů a pacientů s pozměněným karyotypem (Hou et al., 2015). Vliv přítomnosti mutace TP53 na prognózu je významnější u pacientů do 60 let věku. Inaktivace p53 má největší význam zejména v pozdějších fázích leukomogeneze, kdy vznik mutací koresponduje s posunem k agresivnějšímu leukemickému fenotypu buněk (Pavlová et al., 2002).

*Praktická část této bakalářské práce je zaměřena na analýzu mutací v genu TP53 u B-CLL a MDS, proto se dále bude zabývat jen těmito dvěma diagnózami.*

### **2.2.1 B-buněčná chronická lymfocytární leukémie**

Základní charakteristikou tohoto onemocnění je chorobně zvýšená tvorba lymfocytů neboli lymfoproliferace. B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) se řadí mezi nízké maligní onemocnění, typické proliferací a hromaděním klonu malých z morfologického hlediska zrale vypadajících B-lymfocytů nacházejících se v kostní dřeni, lymfatických uzlinách, játrech, slezině a zřídka i v dalších orgánech (Panovská et al., 2011).

Příčina onemocnění není doposud objasněna, a to i přesto, že výskyt hematologické malignity v příbuzenstvu a vyšší věk jsou typickými rizikovými znaky pro B-CLL. Četné výzkumy v oblasti epidemiologie se zabývaly vlivy vnějších faktorů, kterými byly například virové infekce, ionizující záření či karcinogenní chemikálie. Veškeré výstupy těchto výzkumů byly negativní, z čehož vyplývá, že B-CLL je pravděpodobně jedinou leukémií, jejíž výskyt není ovlivněn zmíněnými vnější faktory (Brown, 2009).

Mezi nejvíce frekventovanou leukémií u dospělé populace v západních zemích řadíme právě B-CLL. Díky své incidenci 3:100 000 tvoří v Evropě okolo 30 % všech leukémií. Z celé šire nádorových onemocnění zaujímá tato diagnóza cca 1 %. Nejčastěji postižení jedinci jsou osoby starší 50 let. S dvojnásobnou četností jsou postižení muži oproti ženám, muži mají zároveň horší prognózu onemocnění. U mladších jedinců se onemocnění vyskytuje celkem vzácně, děti nejsou postiženy vůbec. Incidence onemocnění

se pohybuje v rozmezí 3–5 nemocných na 100 000 obyvatel. Při přepočtu na obyvatelstvo České republiky se jedná o 300–500 nových případů ročně (Špaček et al., 2013).

Prognóza onemocnění závisí na množství biologických a klinických faktorů, které přispívají k patogenezi, špatné odpovědi na léčbu a přežívání pacientů. Jedním z významných patogenetických faktorů B-CCL je právě mutace v genu TP53 (Foà et al., 2013). Mezi nejvíce frekventované mutace v genu TP53 se řadí substituce, které představují až 82 % všech mutací vyskytujících se u pacientů s CLL (Špaček et al., 2013). Mutace genu TP53 se nejčastěji objevuje u pacientů v pozdní fázi CLL (Hadrabová, 2015).

### **2.2.2 Myelodysplastický syndrom (MDS)**

Termínem myelodysplastický syndrom se značí získané chronické onemocnění krvetvorby. Jedná se o potenciálně maligní onemocnění krvetvorby, zapříčiněné poruchou na úrovni pluripotentní hematopoetické kmenové buňky (Yoshida, 1996).

Mutace v pluripotentních kmenových buňkách mají za následek poruchu diferenciaci a vyzrání, buňky v kostní dřeni také více odumírají. Jedinci postižení MDS mají v kostní dřeni velké množství nediferenciovaných buněk (blastů) a další krevní elementy vykazují vzhledové abnormality (Hochová et al., 2006).

Předpokládá se, že k primárnímu poškození hematopoetické kmenové buňky u MDS dochází vlivem spontánní nebo indukované mutace, mezi rizikové faktory patří genetická predispozice, věk nemocného (s rostoucím věkem dochází k nárůstu frekvence genových mutací) a expozice vnějším faktorům, vyvolávajícím vznik chromozomálních aberací (aromatické uhlovodíky, ropné produkty, radiační záření) (Málek, 2005). Dalšími důležitými faktory, majícími vliv na patogenezi MDS je aktivace onkogenů a inaktivace tumor supresorových genů, mezi které patří i gen TP53. Mutace genu TP53 se vyskytují u 5–15 % případů MDS (Christiansen et al., 2001).

Selhání krvetvorby s klinickou manifestací cytopenie v periferní krvi a četné transformace do akutní leukémie (asi u jedné třetiny pacientů) představují největší závažnosti tohoto onemocnění. Přítomnost chromozomálních aberací se vyskytuje u více než poloviny pacientů s MDS. Další mutace s největší pravděpodobností vedou k malignizaci onemocnění a jsou příčinou leukemického klonu (Pavlová et al., 2002).

MDS tvoří heterogenní skupinu chorobných stavů, dosud je u nich známo několik cytogenetických odchylek, které jsou úzce spjaty s charakteristickým morfolo­gickým obrazem.

Dle světové zdravotnické organizace WHO (World Health Organization) klasifikujeme myelodysplastický syndrom na základě jeho patogeneze. Tento klasifikační systém navazuje na starší platný FAB (French-American-British) klasifikační systém a patří do souhrnné revize klasifikačního systému zahrnujícího všechna hemato-onkologická onemocnění (Vondráková, 2010) (Tab. 2).

Onemocnění	Periferní krev	Kostní dřeň
refraktorní anémie (RA)	anémie žádné blasty < 1x 10 <sup>9</sup> /l monocytů	pouze erytroidní dysplazie a < 5 % blastů, < 15 % prstenčitých sideroblastů
refraktorní anémie s prstenčitými sideroblasty (RARS)	anémie žádné blasty	pouze erytroidní dysplazie < 5 % blastů, ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů
refraktorní anémie s multilineární dysplazií (RCMD)	cytopenie (bicytopenie nebo pancytopenie) žádné blasty nejsou Auerovy tyče < 1x 10 <sup>9</sup> /l monocytů	dysplazie v ≥ 10 % buněk ve dvou či více myeloidních l liniích < 5 % blastů ve dřeni, nejsou Auerovy tyče, < 15 % prstenčitých sideroblastů
refraktorní cytopenie s multilineární dysplazií a prstenčitými sideroblasty (RCMD-RS)	cytopenie (bicytopenie nebo pancytopenie), žádné blasty nejsou Auerovy tyče < 1x 10 <sup>9</sup> /l monocytů	dysplazie v ≥ 10 % buněk ve dvou či více myeloidních l liniích < 5 % blastů ve dřeni, nejsou Auerovy tyče, ≥ 15 % prstenčitých sideroblastů
refraktorní anémie s přebytkem blastů-1 (RAEB-1)	cytopenie < 5 % blastů nejsou Auerovy tyče < 1x 10 <sup>9</sup> /l monocytů	jednolineární nebo multilineární dysplazie 5–9 % blastů, nejsou Auerovy tyče
refraktorní anémie s přebytkem blastů-2 (RAEB-2)	cytopenie 5–19 % blastů Auerovy tyče, < 1x 10 <sup>9</sup> /l monocytů	jednolineární nebo multilineární dysplazie 10–19 % blastů, Auerovy tyče ±
myelodysplastický syndrom, neklasifikovaný (MDS-U)	cytopenie nejsou blasty či Auerovy tyče	jednolineární granulocytární či megakaryocytární dysplazie < 5 % blastů, nejsou Auerovy tyče
MDS asociovaný s izolovanou del(5q)	anémie < 5 % blastů destičky normální či zvýšené	normální či zvýšené megakaryocyty s hypolobulovanými jádry < 5 % blastů, nejsou Auerovy tyče, izolovaný del(5q)

Tabulka 2: Klasifikace myelodysplastického syndromu dle WHO.

(Zdroj: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/myelodysplasticky-syndrom-458605>)

### 5q- syndrom

Myelodysplastické syndromy, u kterých je nalezena se izolovaná delece dlouhého raménka na 5. chromozomu se označují jako 5q- syndrom. Dle klasifikace WHO je 5q- syndrom považován za samostatný subtyp MDS, a to z důvodu celkové lepší prognózy nemocných.

Jedná se o subtyp MDS, mezi jeho typické znaky patří makrocytární anémie refrakterní a refrakterní s prstenčitými sideroblasty, většinou s trombocytózou v periferní



krvi. Tento subtyp byl poprvé popsán van der Berghem v roce 1974. Pro morfologický nále z v kostní dřeni jsou charakteristické hypolobulizované megakaryocyty, počet blastů v kostní dřeni nepřesahuje 5 %. Na rozdíl od primárních MDS, 5q- syndrom nejčastěji postihuje ženy (Hochová et al., 2007).

### **Role mutace genu TP53 v prognóze 5q- syndromu**

Z diagnostického hlediska vykazují mnohem lepší prognózu pacienti postižení 5q- syndromem v porovnání s pacienty postiženými ostatními typy MDS. Nález mutace TP53 však u 5q- syndromu prognózu výrazně zhoršuje, a to z důvodu četných transformací MDS do akutní myeloidní leukémie (Jädersten et al., 2011).

Aktivace p53 v důsledku ribozomálního stresu je v 5q- syndromu velmi důležitá. V prekurzorových erytroidních buňkách dochází k aktivaci volných ribozomálních proteinů, blokujících navázání proteinu p53 na MDM2 ubiquitin-ligázu, a tím i degradaci p53 v proteazomu. Konkrétně up-regulace dráhy p53 je u 5q- syndromu potenciálním terapeutickým cílem (Fuchs, 2012; Jädersten et al., 2011; Kulasekararaj et al., 2013).

### **3 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

- Osvojení základních molekulárně-biologických metod a systému práce v laboratoři.
- Analýza mutací genu TP53 u 10 vybraných pacientů s chronickou B-lymfocytární leukemií nebo myelodysplastickým syndromem pomocí metody přímého sekvenování.

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Biologický materiál

Do mutační analýzy bylo zařazeno 10 vzorků DNA izolované z mononukleární frakce periferní krve a kostní dřeně pacientů léčených na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Pacienti byli diagnostikováni v rozmezí let 2007 až 2016. Soubor pacientů čítal 2 muže a 8 žen, medián věku byl 70,5 let (rozmezí 38–78 let).

Výchozím materiálem pro izolaci DNA byla periferní krev nebo punktát kostní dřeně. Materiál byl odebrán do plastové zkumavky s antikoagulačním roztokem K<sub>3</sub>EDTA v poměru 1,5 mg na 1 ml materiálu. Po naplnění byla zkumavka promíchána opakovaným převrácením.

Použité pracovní postupy vycházejí ze standardních operačních protokolů Laboratoře molekulární biologie Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc.

### 4.2 Přístrojová technika

- Automatické pipety (Pipetman, Gilson) + jednorázové špičky s filtrem
- Centrifuga C1301R (Labnet)
- Centrifuga 5424 (Eppendorf)
- Centrifuga 5430 R (Eppendorf)
- Centrifuga Biofuge 22 R (Heraeus)
- Dokumentační systém AlphaDigiDoc RT2 s transiluminátorem a integrovanou kamerou (Alpha Innotech)
- Elektroforetická vana s příslušenstvím (Bio-Rad)
- Genetický analyzátor ABI PRISM 3100 + 96 jamková destička (Applied Biosystems)
- Lednice (4-8 °C), C4298 (Vestfrost)
- Mikrovlnná trouba 1195 (ETA)
- Mrazicí boxy (-80 °C, -20 °C), (Sanyo)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- Stolní minicentrifuga C 1301 (Labnet)
- Termocykler PeqSTAR 2x Gradient (PEQLAB)
- Thermal Cyclor T100 (Bio-Rad)
- TermostatBlock Bio TDB-1 (Biosan)
- UV transiluminátor (Biostep)
- Výrobek ledu Icematic F100 Compact (CastelMac SpA)
- Zařízení na úpravu vody Direct-Q UV3 (Millipore)
- Zdroj napětí pro elektroforézu (VWR)
- Zdroj napětí pro elektroforézu PS9009 (Apelex)

### 4.3 Chemikálie a spotřební materiál

- Agaróza (Amresco, LLC)
  - Ampli Taq Gold Taq DNA polymeráza (Applied Biosystems), koncentrace 5 U/ul
  - BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
  - 6x Blue/Orange Loading Dye (Promega)
  - Deionizovaný formamid (Applied Biosystems)
  - DNA ladder 100 bp (Promega)
  - dNTPs (Promega), koncentrace 10 mmol/l
  - 70% ethanol (Fagron)
  - 96% ethanol (Fagron)
  - Ethidium bromid (Top-Bio)
  - Isopropanol (Mikrochem)
  - MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), koncentrace 25 mmol/l
  - Octan sodný, koncentrace 3 mol/l (lékárna FNOL)
  - PBS (lékárna FNOL)
  - 10x PCR Buffer II -MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems)
  - QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
  - Reverzně osmotická a ultračistá voda (Millipore)
  - 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
  - Tris (lékárna FNOL), koncentrace 10 mmol/l; pH 7,5
- 
- Alobal
  - Izolepa
  - Laboratorní sklo
  - Latexové ochranné rukavice
  - Ledová drť
  - Mikrozumavky (2ml;1,5ml)
  - Miska na ledovou drť
  - Nůžky
  - Ochranné brýle
  - PCR mikrozumavky (0,5ml; 0,2ml)
  - Popisovací fix
  - Skalpel
  - Stojánky na mikrozumavky a PCR mikrozumavky

### 4.4 Přehled metod – teorie

#### Detekce mutací v genu TP53 přímým sekvenováním

V sekvenci genu TP53 kódující protein p53 jsou detekovány bodové mutace a krátké delece přímým sekvenováním na analyzátoru ABI PRISM™ 3100. V kódující sekvenci genu TP53 bylo popsáno více jak 20 000 bodových mutací. Některé z nich mají výrazný dopad na snížení funkčnosti proteinu p53.

Pacienti s těmito mutacemi jsou hodnoceni jako rizikovější. Je u nich rovněž předpokládána snížená účinnost léčby chemoterapeutiky, které využívají dráhu p53. Sekvenovány jsou exony 5, 6, 7 a 8 kódující DNA vazebnou doménu, ve kterých se nachází 95 % všech mutací TP53.

Hrubá data získaná ze sekvenátoru byla za pomoci počítačového programu Chromas a webového nástroje Blast srovnávána s referenčními sekvencemi.

#### 4.4.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je biochemická reakce sloužící k amplifikaci cílového úseku DNA, ohraničeného párem syntetických oligonukleotidů – tzv. primerů (Obr. 9).

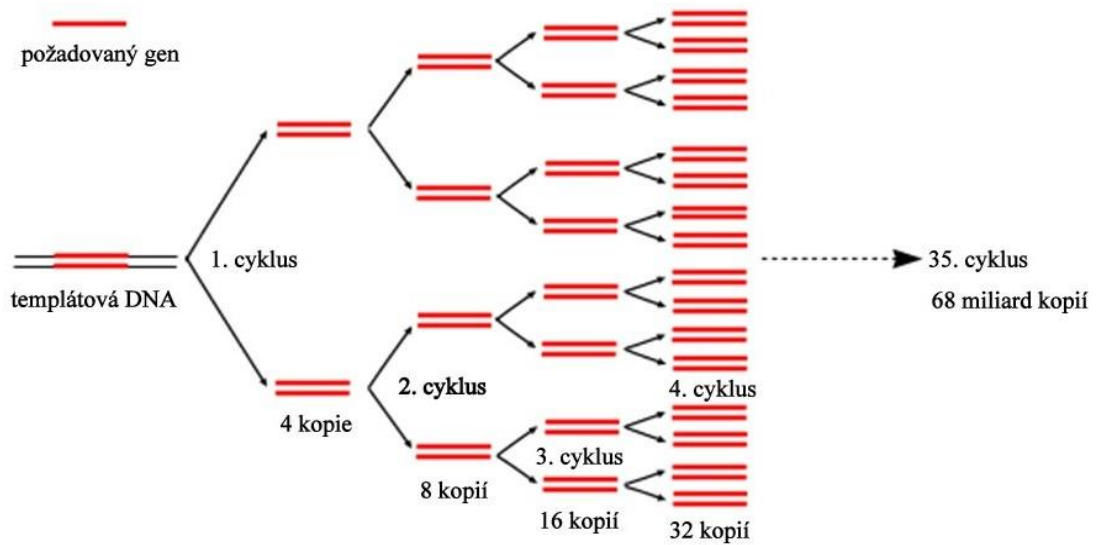
Amplifikaci DNA zajišťuje termostabilní DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, nazývaná jako Taq polymeráza. Základní jednotku polymerázové řetězové reakce tvoří jeden cyklus skládající se ze tří kroků: denaturace, nasednutí primerů a syntézy DNA (Obr. 10). V průběhu PCR dochází k několikanásobnému opakování (nejčastěji v rozmezí 25–35 cyklů).

V prvním kroku je genomická DNA denaturována zahřátím na teplotu v rozmezí 92–95 °C. Dochází k úplnému rozvolnění dvouřetězcové molekuly DNA na dva samostatné řetězce.

V dalším kroku se na templátovou DNA na základě komplementarity vážou oligonukleotidové primery (optimální teplota nasedání primerů bývá zhruba o 5 °C nižší, nejčastěji v rozmezí 50–60 °C).

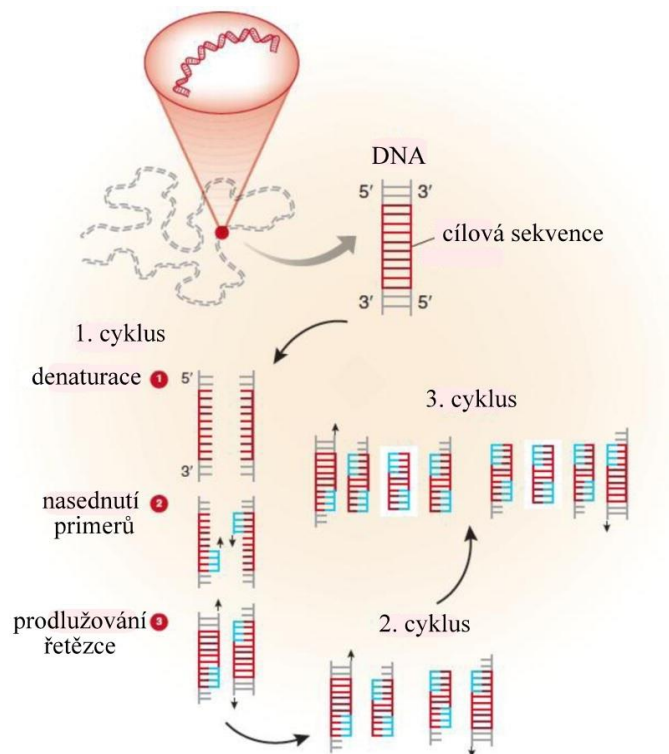
Syntéza nově vznikajícího vlákna DNA je zajišťována polymerázou, která k nasednutým primerům na základě komplementarity k templátové DNA postupně připojuje volné nukleotidy a vytváří tak nové vlákno DNA. Syntéza DNA obvykle probíhá při 70–72 °C.

Tyto kroky reakce se cyklicky opakují do té doby, až je dosažen potřebný stupeň amplifikace. Amplifikace probíhá exponenciálně, v každém kroku se množství PCR produktu zdvojnásobí (Joshi et al., 2010; Snustad et al. 2009).



Obr. 9: **Exponenciální nárůst koncentrace PCR produktu během amplifikace.** Amplifikace DNA produktů v průběhu PCR reakce během každého cyklu exponenciálně narůstá.

(Zdroj: <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=186&sim=321&cnt=1>; upraveno)



Obr. 10: **Průběh PCR reakce.** Prvním krokem PCR reakce je denaturace, kdy dochází k rozrušení vodíkových můstků. Následuje nasednutí primerů na komplementární úsek jednořetězcové DNA a syntéza nově vznikající dvouřetězcové DNA.

(Zdroj: Garibyan et al., 2013; upraveno)

#### 4.4.2 Elektroforéza

Elektroforéza je analytická metoda umožňující separaci volných elektricky nabitých částic v roztoku, za působení stejnosměrného elektrického proudu. V závislosti na rozdílných elektroforetických mobilitách dochází k oddělení nabitých molekul – iontů.

Součástí nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny, díky kterým se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě. Dlouhé fragmenty DNA migrují pomaleji, na rozdíl od DNA fragmentů kratších.

Elektroforéza se provádí na vhodném gelovém nosiči, který je ponořen do elektroforetického pufru. Gely vytváří síťovitou strukturu polymerních molekul s póry. Koncentrace polymeru je významným faktorem pro mobilitu DNA. V případě, že má polymer vyšší koncentraci, dochází k lepší separaci krátkých DNA fragmentů. Velikost pórů lze ovlivnit koncentrací polymeru a složením roztoku. Rychlost pohybu molekul DNA v gelu je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti (Lee et al., 2012; Snustad et al. 2009; Stellwagen, 2009).

K identifikaci polohy separovaných molekul je třeba zviditelnit molekuly DNA pomocí vhodného barviva (např. interkalační barvivo ethidium bromid), které po navázání na DNA fluoreskuje pod ultrafialovým zářením. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou na gelu ve formě proužků, intenzita těchto proužků je přímo úměrná koncentraci DNA (Sigmon et al., 1996).

#### 4.4.3 Sangerovo sekvenování DNA

##### Sangerova sekvenační reakce

Cílem sekvenování DNA je určení pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Znalost pořadí nukleotidů v DNA je využívána k odvozování informací o sekvenci aminokyselin kódujících proteiny, o regulaci jejich tvorby a rovněž umožňuje detailní stanovení charakteru mutací. Mezi metody, umožňující stanovení pořadí nukleotidů patří sekvenování dle Sangera. Principem Sangerova sekvenování je specifická inhibice enzymové syntézy DNA řetězců.

Sekvence DNA, která má být stanovena, je použita jako matrice k nasyntetizování komplementárních řetězců o různé délce prostřednictvím DNA polymerázy. Řetězec na matricové DNA je syntetizován od místa, na které je připojen primer se specifickou sekvencí pro sekvenování. Syntéza matricového řetězce DNA je ukončena v místě, kde je do prodlužovacího řetězce namísto běžného deoxyribonukleosidtrifosfátu začleněn jeho

fluorescenčně značený analog 2', 3'- dideoxyribonukleosidtrifosfát (ddNTP). ddNTP postrádá 3'-OH skupinu, po začlenění do prodlužujícího řetězce DNA slouží jako koncový inhibitor syntézy DNA. Z důvodu nepřítomnosti 3'-OH skupiny není DNA polymeráza schopna k němu připojit další nukleotid a syntéza nového vlákna DNA je tímto ukončena.

O tom, jak dlouhé řetězce, náhodně zakončené v místě začlenění ddNTP budou DNA polymerázou syntetizovány, rozhoduje vhodný poměr mezi ddNTP a odpovídajícím dNTP (Heather et al., 2016; Sanger et al., 1977; Snustad et al., 2009).

#### Automatické sekvenování pomocí kapilární elektroforézy

Automatické sekvenování je prováděno pomocí kapilární elektroforézy v automatickém sekvenátoru. V kapiláře probíhá separace produktů Sangerovy sekvenační reakce na základě velikosti, fluorescenční signál terminačního ddNTP je snímán pomocí laseru. Konečným výstupem výsledků automatického sekvenačního procesu je vizualizace nukleotidové sekvence úseku DNA (Karger et al., 2009), tzv. sekvenogram (Příloha 3).

### **4.5 Pracovní postupy**

#### **4.5.1 Separace mononukleární frakce buněk (MNC)**

- Vzorek periferní krve nebo kostní dřeně v 50 ml zkumavce naředit v poměru 1:1 s PBS.
- Navrstvit na 3 ml Histopaque v 15 ml zkumavce.
- Stočit při 2000 rpm, 20 min, při teplotě 4 °C.
- Stáhnout prstenec MNC do 50 ml zkumavky, doplnit do 15–20 ml 1 x PBS.
- Stočit 5 min při 3500 rpm, slít.

#### **4.5.2 Izolace DNA**

- Buňky přemístit do 2ml šroubovací mikrozukavky, stočit 2 min při 3000 rpm. Podle velikosti peletu přidat následující množství roztoků:

roztok 1 (cell lysis buffer)		roztok 2 (protein precipitation buffer)
300 µl	+	100 µl
600 µl	+	200 µl
900 µl	+	300 µl

- Inkubovat 5 min na vortexu.
- Stočit 5 min, při 10 000 rpm.



- Supernatant přenést do vymraženého izopropanolu ve 2ml šroubovací mikrozkuhavce – stejný objem, jako jsme dávali roztok 1 (300, 600, 900  $\mu$ l)
- Lehce protřepat zkumavku v prstech, musí se vytvořit bílá sraženina, tu pipetou přenést do 1,5ml šroubovací mikrozkuhavky.
- Dvakrát promýt 1 ml vymraženého 70% ethanolu, stočit 2 min, při 10 000 rpm.
- Ethanol odsát, pelet vysušit (30 min, otevřená zkumavka, přikrýt buničitou vatou).
- Přidat okolo 10 mM Tris v závislosti na velikosti peletu, nechat rozpouštět do druhého dne.

#### 4.5.3 Spektrofotometrické měření koncentrace DNA na NanoDropu

- Změřit koncentraci na spektrofotometru NanoDrop. Naředit pomocí 10 mM Tris na koncentraci přibližně 100 ng/ $\mu$ l.

#### 4.5.4 PCR

V prvním kroku se amplifikují úseky z DNA odpovídající exonům 5, 6, 7, 8 za použití odpovídajících primerů (TP53\_5F, TP53\_5R, TP53\_6F, TP53\_6R, TP53\_7F, TP53\_7R, TP53\_8F, TP53\_8R).

- PCR reakci provádět na ledě.
- Připravit PCR reakční mix pro každou PCR reakci dle počtu vzorků (viz Tab. 3)
- Reakční mix rozpipetovat po 49  $\mu$ l do jednotlivých PCR zkumavek a přidat 1,5  $\mu$ l templátové DNA.
- Vše řádně zcentrifugovat.
- PCR reakční směs inkubovat v thermocykleru dle teplotního profilu PCR reakce (Tab. 4), teplota nasednutí jednotlivých primerů (Tab. 5).

Reagencie	Výsledná koncentrace	Objem na 1 vzorek ( $\mu$ l)
Reverzně osmotická a ultračistá H <sub>2</sub> O	-	36,7
PCR Buffer II (-MgCl <sub>2</sub> )	1x	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mmol/l	3
dNTPs	0,2 mmol/l	1
Primer F	20 pmol/reakci = 0,4 pmol/ $\mu$ l	2
Primer R	10 pmol/reakci = 0,2 pmol/ $\mu$ l	1
Ampli Taq Gold DNA Polymerase	1,5 U/ $\mu$ l	0,3
DNA	2 ng/ $\mu$ l	1,5

Tabulka 3: Pipetovací schéma pro PCR reakci.

94 °C	94 °C	<b>Dle exonů</b>	72 °C	72 °C
4 min	40 s	40 s	1 min	10 min
<b>35x</b>				

Tabulka 4: **Teplotní profil PCR reakce.**

<b>Číslo exonu</b>	<b>Teplota (°C)</b>
5	55
6	60
7	67
8	58

Tabulka 5: **Teploty nasedání primerů.**

#### 4.5.5 Elektroforetická detekce PCR produktu

- Připravit 1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru s ethidium bromidem (10 µl na 100 ml gelu).
- Do první jamky na gelu napipetovat 10 µl markeru.
- Do následujících jamek nanést 20 µl PCR produktu smíchaného s 5 µl nanášecího pufru.
- Nechat separovat při napětí 110 V cca 45–60 minut.
- Vizualizovat pod UV světlem.

#### 4.5.6 Extrakce PCR produktu z gelu

- Pomocí skalpelu vyříznout fragmenty DNA, odpovídající exonům 5, 6, 7 a 8.
- Přenést do 1,5 ml mikrozkuavky.
- Přidat 600 µl QG pufru, inkubovat 10 min při 50 °C v termostatickém bloku.
- Přenést celý objem mikrozkuavky na kolonku, stočit 1 min při 13 000 rpm, pufr vylít.
- Centrifugovat 1 min při otáčkách 13 000 rpm.
- Na kolonku přidat 500 µl QG pufru, stočit 1 min při 13 000 rpm, pufr vylít.
- Na kolonku přidat 725 µl PE pufru, stočit 1 min při 13 000 rpm, pufr vylít.
- Z důvodu vysušení kolonku stočit 2 min při 13 000 rpm.
- Kolonku přenést do čisté označené 1,5 ml mikrozkuavky. doprostřed kolonky přidat 40 µl EB pufru.
- Centrifugovat 1,5 min při 13 000 rpm.
- Koncentraci extrahované DNA změřit spektrofotometricky pomocí NanoDropu.
- Za ideální je považována koncentrace přibližně 20 ng/µl.

#### 4.5.7 Sekvenační reakce

- Sekvenační reakci provádět na ledě.
- Do PCR zkumavek (0,2 ml) napipetovat reagentie (dle Tab. 6).
- Vše řádně zcentrifugovat.
- PCR zkumavky umístit do termocykleru při určitém teplotním profilu (Tab. 7).

Reagentie	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Objem 1 vzorek (μl)
Reverzně osmotická a ultračistá H <sub>2</sub> O + purifikovaný templát	-	-	6
5x Sequencing Buffer	5x	0,5 x	1
Sekvenační primer	5 pmol/μl	5 pmol/reakce	1
Sequencing MIX (BigDye)	5x	1x	2

Tabulka 6: Schéma pipetování sekvenační PCR reakce.

Teplota (°C)	Čas (min)	Opakování cyklu
95	5	-
95	0,5	-
53	0,25	28x
60	4	-

Tabulka 7: Teplotní profil sekvenační reakce.

#### 4.5.8 Přečištění produktu sekvenační reakce

- Do 1,5ml zkumavek napipetovat 25 μl vymraženého 96% ethanolu a 1 μl octanu sodného, přenést tam celý objem sekvenační reakce.
- Protřepat, nechat precipitovat 15 min při -80 °C.
- Centrifugovat 15 min při 16 500 rpm, 4 °C.
- Promýt 50 μl vymraženého 70% ethanolu.
- Pelet usušit ve tmě (cca 30 min).
- Pelet rozpustit ve 20 μl deionizovaného formamidu, přenést do 96-jamkové sekvenační destičky, zavřít a stočit.
- Denaturace 5 min při 95 °C v cykleru, ihned zchladit na ledu.

#### **4.5.9 Vlastní sekvenování – kapilární elektroforéza**

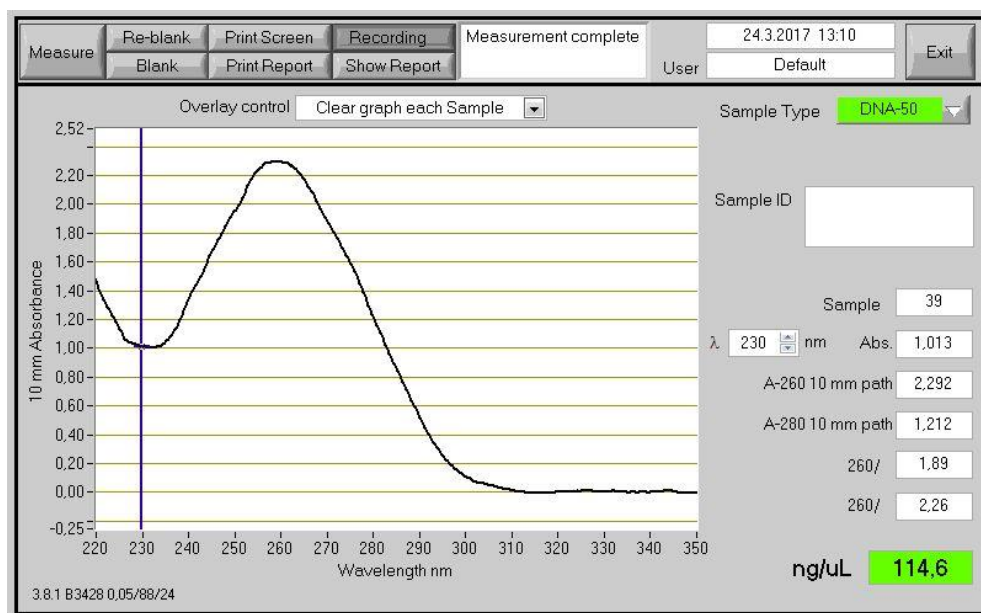
- Destičku s denaturovanými vzorky ve formamidu vložit do sekvenátoru a spustit kapilární elektroforézu.
- Získané sekvence vyhodnotit pomocí softwaru Chromas a porovnat s referenčními sekvencemi (Příloha 2) pomocí webového nástroje BLAST.

## 5 VÝSLEDKY

Praktická část této bakalářské práce si kladla za cíl mutační analýzu vybraných exonů genu TP53 u pacientů postižených B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií nebo myelodysplastickým syndromem.

Jako analyzovaný materiál sloužila venózní krev a kostní dřeň. Celkově bylo vyšetřeno 10 pacientů léčených na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Soubor pacientů zahrnoval 8 žen a 2 muže ve věku 38 až 78 let. Analýza těchto pacientů probíhala od března 2016 do září 2016.

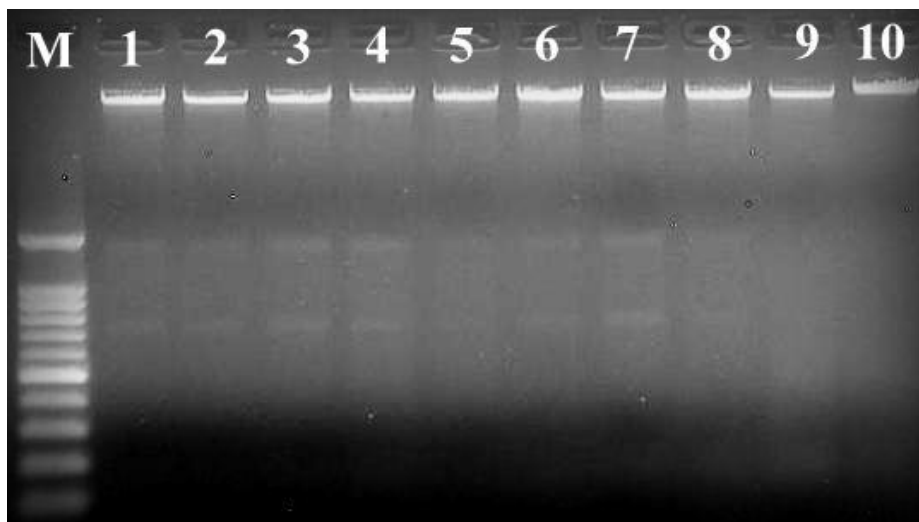
Během mutační analýzy byly postupně využity molekulárně-biologické metody, jejichž podrobný postup je uveden v kapitole 4.5 Pracovní postupy. Prvním krokem byla separace mononukleární frakce buněk pomocí hustotního gradientu Histopaque-1077, následovala izolace DNA, jejíž koncentrace byla spektrofotometricky stanovena pomocí NanoDropu (Obr. 11).



Obr. 11: **Křivka a stanovení koncentrace izolované DNA.** V pravém dolním rohu je v jednotkách ng/μl vyjádřena hodnota koncentrace vzorku analyzované DNA při vlnové délce 260 nm.

(Zdroj: NanoDrop software)

Po změření koncentrace byla provedena kontrola kvality („nefragmentovanosti“) izolované DNA elektroforetickou detekcí na 1% agarózovém gelu (Obr. 12).

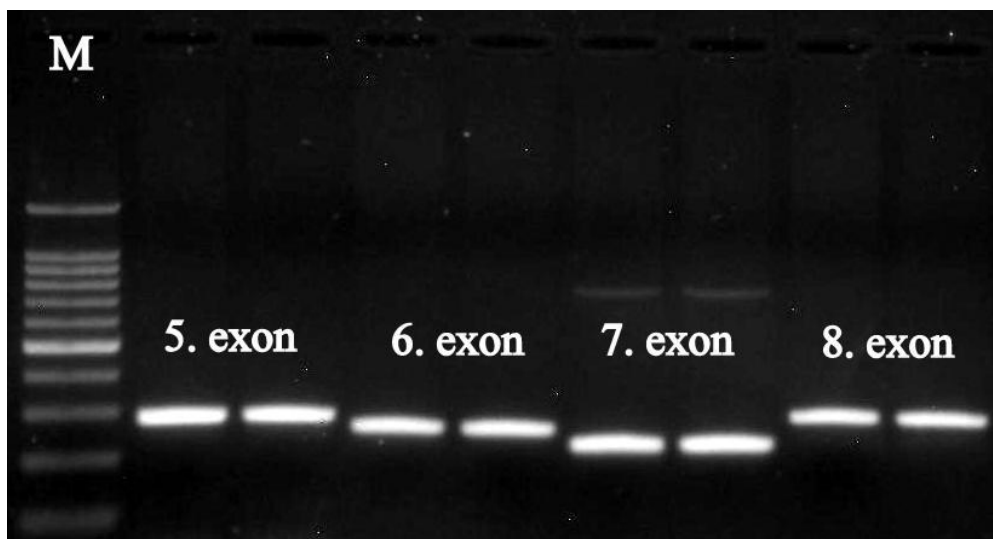


(Obr. 12: **Elektroforetogram izolované DNA na agarózovém gelu.** Vlevo je napipetován marker molekulové hmotnosti (M), v následujících jamkách jsou naneseny vzorky DNA analyzovaných pacientů (1–10).

(Zdroj: fotografie pořízena pomocí dokumentačního systému AlphaDigiDoc RT2)

DNA od všech analyzovaných pacientů se podařilo izolovat v dostatečné koncentraci (Obr. 11) a kvalitě (Obr. 12), byla proto dále využitelná pro PCR a sekvenční analýzu.

V polymerázové řetězové reakci byly za použití čtyř párů primerů (Příloha č. 1) amplifikovány úseky DNA odpovídající exonům 5, 6, 7 a 8. Následně byly produkty polymerázové řetězové reakce podrobeny elektroforetické detekci (Obr. 13).



Obr. 13: Elektroforetogram PCR produktů na agarózovém gelu. Vlevo je napipetován marker molekulové hmotnosti (M), v následujících jamkách jsou naneseny PCR produkty amplifikované DNA odpovídající exonům 5, 6, 7 a 8. (Zdroj: fotografie pořízena pomocí dokumentačního systému AlphaDigiDoc RT2)

Po ověření dostatečné koncentrace a specifity byly produkty PCR reakce extrahovány z agarózového gelu pomocí extrakčního kitu od firmy Qiagen a jejich koncentrace byla spektrofotometricky změřena pomocí NanoDropu. Následně byla provedena Sangerova sekvenační reakce a ethanolová precipitace produktů této reakce. Po rozpuštění peletu v deionizovaném formamidu proběhlo vlastní sekvenování pomocí kapilární elektroforézy. Výsledky sekvenační analýzy byly získány na základě srovnání s referenční sekvencí genu TP53 (číslo referenční sekvence: NM\_000546). Soubor vyšetřených pacientů, včetně výsledků mutační analýzy je uveden níže (Tab. 8).

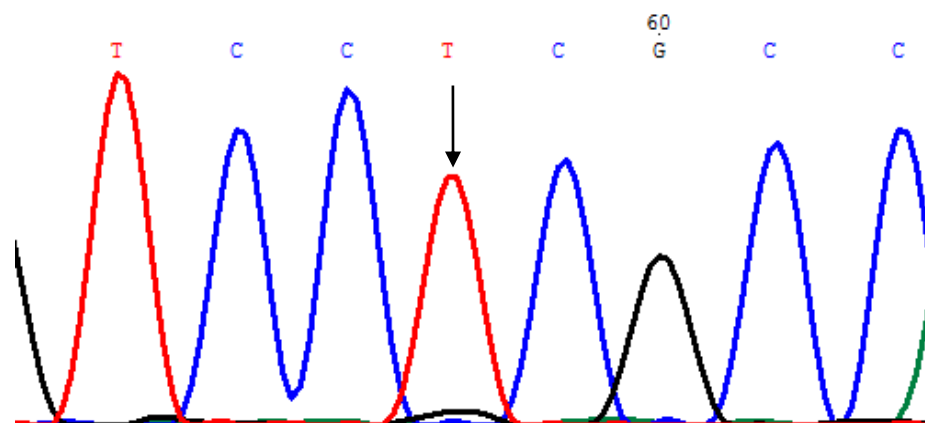
Pacient číslo	Iniciály	Rok narození	Pohlaví	Biologický materiál	Diagnóza	Mutace
1	LO	1939	žena	periferní krev	MDS 5q-	nenalezena
2	AL	1942	žena	periferní krev	MDS 5q-	nenalezena
3	IF	1944	žena	kostní dřeň	MDS 5q-	nenalezena
4	PZ	1945	muž	periferní krev	B-CLL	<b>nalezena</b>
5	VV	1946	žena	kostní dřeň	MDS 5q-	<b>nalezena</b>
6	AM	1947	žena	periferní krev	MDS 5q-	nenalezena
7	AO	1948	žena	periferní krev	MDS 5q-	nenalezena
8	FČ	1948	muž	periferní krev	B-CLL	<b>nalezena</b>
9	ZN	1963	žena	periferní krev	B-CLL	nenalezena
10	RS	1979	žena	periferní krev	MDS 5q-	nenalezena

Tabulka 8: Soubor analyzovaných pacientů.

Exony 5, 6, 7 a 8 byly osekvenovány u každého z 10 pacientů, s cílem detekovat mutace genu TP53. Tři pacienti z vybraného souboru mutací v genu TP53 vykazovali (Tab. 9), u zbývajících sedmi žádná mutace nalezena nebyla. U jednoho z pacientů nesoucích mutaci (pacient č. 8) byl současně nalezen i polymorfismus v exonu 6. Sekvenogramy nalezených mutací a jednoho polymorfismu znázorňují obrázky 14–17.

Pacient číslo	Iniciály	Exon	Kodon	Záměna nukleotidů	Záměna aminokyselin
4	PZ	5	158	CGC-CTC	Arg-Leu (R158L)
5	VV	5	175	CGC-CAC	Arg-His (R175H)
8	FČ	5	176	TGC-AGC	Cys-Ser (C176S)
8	FČ	6	213	CGA-CGG	Arg-Arg (R213R)

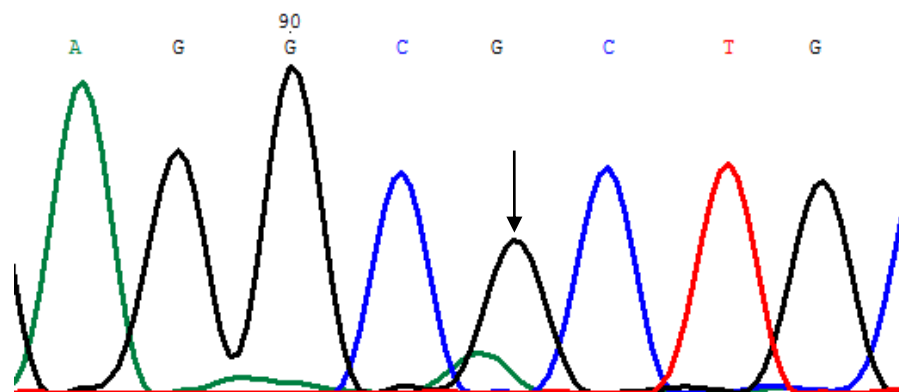
Tabulka 9: Souhrn nalezených mutací v genu TP53.



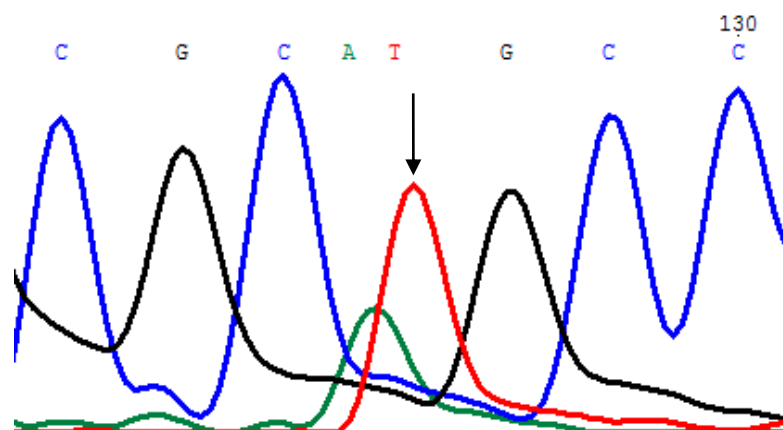
Obr. 14: Sekvenogram, výstup z programu Chromas. Mutace nalezena v exonu 5 u pacienta č. 4. Šipkou je vyznačena bodová mutace – změna v jednom nukleotidu. Orientační zastoupení mutované alely 100 %.

(Zdroj: Chromas software)

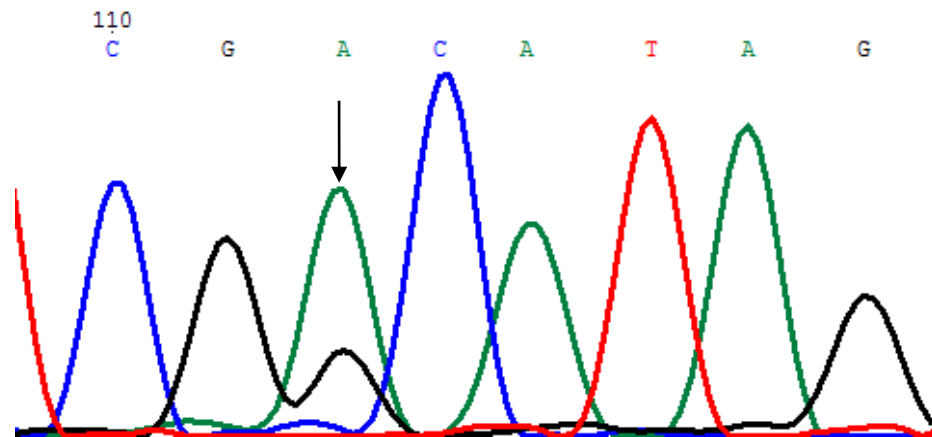




Obr. 15: Sekvenogram, výstup z programu Chromas. Mutace nalezena v exonu 5 u pacienta č. 5. Šipkou je vyznačena bodová mutace – změna v jednom nukleotidu. Orientační zastoupení mutované alely cca 20 %. (Zdroj: Chromas software)



Obr. 16: Sekvenogram, výstup z programu Chromas. Mutace nalezena v exonu 5 u pacienta č. 8. Šipkou je vyznačena bodová mutace – změna v jednom nukleotidu. Orientační zastoupení mutované alely cca 30 %. (Zdroj: Chromas software)



Obr. 17: **Sekvenogram, výstup z programu Chromas.** Polymorfismus (označen šipkou) nalezen v exonu 6 u pacienta č. 8. Orientační zastoupení mutované alely cca 30 %.

(Zdroj: Chromas software)

Nalezené mutace přímo mění genetickou informaci genu, a tím výrazně postihují funkčnost proteinu. Ke změně docházelo vždy v jednom nukleotidu, jde o tzv. bodové mutace, substitučního typu. U pacienta č. 4 došlo k transverzi (záměně purinové báze za bázi pyrimidinovou). Pacient č. 5 vykazoval tranzici (záměnu purinové báze za purinovou bázi). U pacienta č. 8 došlo v 5. exonu k transverzi a v 6. exonu k neutrální mutaci, kdy zařazením odlišného nukleotidu se nemění smysl kodonu, který nadále kóduje stejnou aminokyselinu.

Přítomné substituce mají vliv na zařazení jiné dusíkaté báze, než by odpovídalo původní genetické informaci a pravidlům komplementarity. Výsledkem substituce byla v těchto případech ztrátová mutace, kdy zařazením odlišného nukleotidu došlo ke změně smyslu kodonu, translace poté vede k zařazení odlišné aminokyseliny a tím i změně funkce proteinu.

Všechny detekované mutace se vyskytují v centrální doméně proteinu p53, což koresponduje s literárními zdroji, které rovněž uvádějí nejvyšší počet lokalizovaných mutací právě v centrální doméně. První dvě z detekovaných mutací (u pacienta č. 4 a pacienta č. 5) se řadí mezi hot spot mutace, neboť se nachází v jednom ze šesti míst v centrální doméně, kde je frekvence mutací nejvyšší. Mutace u pacienta č. 8 v exonu 5 se díky své frekvenci výskytu, která je nižší než u dvou předchozích nalezených mutací, řadí mezi časté mutace. Poslední detekovanou změnu, taktéž u pacienta č. 8, v exonu 6 neřadíme mezi mutace, jedná se o polymorfismus. Nebyla objevena žádná nová mutace, neboť každá z nalezených mutací již existuje a byla náležitě popsána.

## 6 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce byla analýza mutací tumor supresorového genu TP53 u 10 pacientů postižených B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií nebo myelodysplastickým syndromem. Medián věku analyzovaného souboru pacientů byl 70,5 let, zahrnoval 8 žen a 2 muže. K mutační analýze byla použita metoda přímého Sangerova sekvenování. Tato metoda byla první komerčně dostupnou metodou sekvenování, zároveň je i přes svou časovou náročnost a pracnost, rozšířená v mnoha laboratořích. V uplynulých letech však sekvenační technika zaznamenala velký pokrok, zejména díky sekvenátorům nové generace (Koubková et al., 2014).

Mezi moderní technologie sekvenace DNA řadíme sekvenování nové generace (NGS). Metoda NGS umožňuje v průběhu krátkého času paralelní sekvenaci až tisíců sekvenačních templátů, zatímco u Sangerova sekvenování je možná identifikace sekvence pouze do velikosti 900 bp. Finanční náročnost NGS se od jeho zavedení velmi rapidně snižuje, v současnosti je již srovnatelná s cenou Sangerova přímého sekvenování. Základem těchto sekvenátorů je vytvoření DNA knihovny, sekvenování a analýza dat (Park et al., 2016).

Často diskutovanou problematikou je citlivost různých sekvenačních přístupů a význam minoritních klonů v patogenezi onemocnění. Udávaná citlivost Sangerova sekvenování je mezi 10–30 %, (tzn., že minoritní klony s nižším zastoupením nejsme schopni touto metodou odhalit), zatímco u NGS sekvenátorů je deklarována senzitivita i méně než jedna desetina procenta. Otázkou však nadále zůstává klinická relevance takto získaných dat. U majoritních klonů detekovaných pomocí Sangerova sekvenování se díky jejich vysokému procentuálnímu zastoupení předpokládá významný podíl na klinickém průběhu onemocnění a léčebné odpovědi, naopak význam minoritních klonů s mutací je stále předmětem vědeckého zkoumání a diskuzí (Kriangkum et al., 2015).

V poslední době však bylo prokázáno, že i původně minoritní klony vlivem klonální evoluce a selekce v průběhu terapie mohou expandovat a v pozdějších stádiích onemocnění hrát významnou roli. Selektce klonů s mutací TP53 se pojí s progresí onemocnění a relapsem. Selektce je rovněž nezbytná pro evoluci agresivního rezistentního onemocnění. Předpokládá se, že detekce minoritních klonů s TP53 mutací před léčebným procesem může v budoucnu významně ovlivnit volbu léčby pro následující postup během relapsu onemocnění (Staňo Kozubík et al., 2012).

S nástupem moderních technologií sekvenování se Sangerovo sekvenování dostává do pozadí, nicméně je nutné dodat, že pro mnohé laboratoře stále zůstává nejdostupnějším sekvenačním přístupem a současně má stále nedocenitelnou úlohu při verifikaci mutací nalezených pomocí NGS.

## 7 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala problematikou mutační analýzy tumor supresorového genu TP53 u dvou vybraných typů hematologických malignit: B-buněčné chronické lymfocytární leukémie a myelodysplastického syndromu. V rámci teoretické části práce byla vypracována literární rešerše, která tuto problematiku shrnuje.

Experimentální část práce byla zaměřena na analýzu souboru 10 pacientů postižených B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií nebo myelodysplastickým syndromem, s cílem odhalit přítomné mutace v testovaných exonech 5–8.

Z analyzovaného souboru deseti pacientů vykazovali přítomnost mutace tři jedinci. Byly nalezeny tři mutace: R158L, R175H, C176S a jeden polymorfismus R213R. Všechny přítomné mutace byly detekovány v exonu 5, jediný polymorfismus byl detekován v exonu 6. Mutační analýza genu TP53 má hlavně klinický význam, na základě výsledků analýzy je prováděna volba vhodné léčebné strategie.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

### Odborné články:

Ahuja, D., Sáenz-Robles M. T. and Pipas, J. M. 2005. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24:7729-7745.

Appella, E. and Anderson, C. W. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem*, 268: 2764-2772.

Ashcroft, M. and Vousden, K. H. 1999. Regulation of p53 stability. *Journal*, 53: p7637-7643.

Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. G. and Vousden K. H. 1999. Regulation of p53 Function and Stability by Phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 19(3): 1751-1758.

Baker, S. J., Fearon E. R., Nigro J. M., Hamilton S. R., Preisinger A. C., Jessup J. M., vanTuinen P., Ledbetter D. H., Barker D. F., Nakamura Y., White R. and Vogelstein, B. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 14;244(4901):217-21.

Bates, S. and Vousden, K. H. 1999. Mechanism of p53-mediated apoptosis. *Cell mol life sci*, 55 (1): 28-37.

Beckerman, R. and Prives, C. 2010. Transcriptional by P53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(8): a000935.

Benjamin, C. L., Melnikova V. O. and Ananthaswamy, H. N. 2008. P53 protein and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol*, 624: 265-82.

Berggren, P., Steineck, G., Adolfsson, J., Hansson, J., Jansson, O., Larsson, P., Sandstedt, B., Wijkström, H. and Hemminki, K. 2001. p53 mutations in urinary bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 84(11), 1505-1511.

Brachova, P., Mueting, S. R., Carlson, M. J., Goodheart, M. J., Button, A. M., Mott, S. L., Dai, D., Thiel, K. W., Devor, E. J. and Leslie, K. K. 2015. TP53 oncomorphic mutations predict resistance to platinum- and taxane-based standard chemotherapy in patients diagnosed with advanced serous ovarian carcinoma. *International Journal of Oncology*, 46;(2): 607-618.

Brooks, C. L. and Gu, W. 2001. p53 Regulation by Ubiquitin. *FEBS Lett*, 585(18): 2803-2809.

Brown, J. R. (2008). Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Expert Review of Hematology*, 1(1), 51-61.

Butler, J. S. and Loh, S. N. 2005. Kinetic partitioning during folding of the p53 DNA binding domain. *J Mol Biol*, 350(5):906-18.

Bykov, V. J. N., Lambert, J. M. R., Hainaut, P. and Wiman, K. G. 2009. Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. *Cell Cycle*, 8:16, 2509-2017.

Calado, R. and Young, N. 2012. *F1000 Med Reports*, 4:8.

Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M. A., Iggo, R. and Fronza, G. 2001. p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene*, 20:3573-3579.

- Cino, E. A., Soares, I. N., Pedrote, M. M., de Oliveira, G. A. P. and Silva, J. L. 2016. Aggregation tendencies in the p53 family are modulated by backbone hydrogen bonds. *Scientific Reports*, 6:32535.
- Davis, J. R., Mossalam, M. and Lim, C.S. 2013. Controlled Access of p53 to the Nucleus Regulates its Proteasomal Degradation by MDM2. *Mol Pharm*, 10(4): 1340-1349.
- Doležalová, L. 2016. Cílová léčba u nádorových onemocnění krve. *Prakt. Lékař*, 12(4): 133-137.
- Efeyan, A. and Serrano, M. 2007. p53: Guardian of the Genome and Policeman of the Onkogenes. *Cell cycle*, 6:9; 1006-1010.
- Falck, J., Lukas, C., Protopopova, M., Lukas, J., Selivanova, G. and Bartek, J. 2001. Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene*, 6;20(39):5503-10.
- Foà, R., Del Giudice, I., Guarini, A., Rossi, D. and Gaidano, G. (2013). Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 98(5), 675-685.
- Freed-Pastor, W. A. and Prives, C. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes and Dev.*, 26: 1268-1286.
- Friedman, P. N., Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C. 1993. The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 15;90(8):3319-23.
- Fuchs, O. 2012. Important Genes in the Pathogenesis of 5q- Syndrome and Their Connection with Ribosomal Stress and the Innate Immune System Pathway. *Leukemia Research and Treatment*, 2012, 179402.
- Gang, L. and Chen, X. 2003. The Activation Domains, the Proline-rich Domain, and the C-terminal Basic Domain in p53 Are Necessary for Acetylation of Histones on the Proximal p21 Promoter and Interaction with p300/CREB-binding Protein. *The Journal of Cell Biology*, M210696200.
- Garrett, M.D. 2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81: 515-522.
- Gariyban, L. and Avashia, N. 2013. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6.
- Hamzehloie, T., Mojarrad, M., Nazarabadi, M. H. and Shekouhi, S. 2012. The Role of Tumor Protein 53 Mutations in Common Human Cancers and Targeting the Murine Double Minute 2–P53 Interaction for Cancer Therapy. *Iran J Med Sci*, 37(1): 3-8.
- Hadrabová, M. 2015. Chronická lymfocytární leukémie. *Onkologie*, 9(3): 107-111.
- Harris, S. L. and Levine, A. J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24 (17) 2899-2908.
- Heather, J.M. and Chain, B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1): 1-8.
- Horn, H.F. and Vousden, K. H. 2007. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 26, 1306-1316.

- Hou H. A., Chou W. C., Kuo Y. Y., Liu, C. Y., Lin, L. I., Tseng, M. H., Chiang Y. C., Liu, M. C., Liu, C. W., Tang, J. L., Yao, M., Li, C. C., Huang, S. Y., Ko, B. S., Hsu, S. C., Chen, C. Y., Lin, C. T., Wu, S. J., Tsay, W., Chen, Y. C. and Tien, H. F. 2015. *TP53* mutations in *de novo* acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution. *Blood Cancer Journal*, 5(7): e331.
- Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A. and Poon, R.Y.C. 2004. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Molecular and Cellular Biology*, 24(8):3536-3551.
- Cheung, K. J., Horsman, D. E. and Gascoyne R. D. 2009. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br J Haematol*, 146(3):257-69.
- Chao, C. C. 2015. Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta*, 1;438:139-47.
- Chen, K., Huang, Y. and Chen, J. 2013. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 732-740
- Christiansen, D. H., Andersen, M. K. and Pedersen-Bjergaard, J. 2001. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol*, 1;19(5):1405-13.
- Israels, E. D. and Israels, L. G. 2001. The cell cycle. *Stem Cells*, 19: 88-91.
- Jädersten, M., Saft, L., Smith, A., Kulasekararaj, A., Pomplun, S., Göhring, G., Hedlund, A., Hast, R., Schlegelberger, B., Porwit, A., Hellström-Lindberg, E. and Mufti, G. J. 2011. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del (5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*, 20;29(15):1971-9.
- Joerger, A. C. and Fersht, A. R. 2010. The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6); a000919.
- Joerger, A. C. and Fersht, A. R. 2007. Structure–function–rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26:2226-2242.
- Jones, R. J. and Armstrong, S. A. 2008. Cancer Stem Cells in Hematopoietic Malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 14(1), 12-16.
- Joshi, M. and Deshpande, J. D. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biochemical Research*, (5) 81-97.
- Karger, B. L. and Guttman, A. 2009. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, 30 (1), S196-S202.
- Kim, M. P., Zhang, Y. and Lozano. 2015. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 5:249.
- Koubková, L., Vojtěšek, B. and Vyzula, R. 2014. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klin Onkol*, 27; (1): S61–S68.
- Koshland, D. E. 1993. Molecule of the year. *Science*, 24; 262 (5142):1953.



- Kriangkum, J., Motz, S. N., Mack, T., Beiggi, S., Baigorri, E., Kuppusamy, H., Belch, A. R., Johnston, J. B. and Pilarski, L. M. 2015. Single-Cell Analysis and Next-Generation Immuno-Sequencing Show That Multiple Clones Persist in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS ONE*, 10(9), e0137232.
- Kulasekararaj, A. G., Smith, A. E., Mian, S. A., Mohamedali, A. M., Krishnamurthy, P., Lea, N. C., Gäken, J., Pennaneach, C., Ireland, R., Czepulkowski, B., Pomplun, S., Marsh, J. C. and Mufti, G. J. 2013. *TP53* mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*, 160: 660-672.
- Lakin, N. K. and Jackson, S. P. 1999. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 7644-7655.
- Lamb, P. and Crawford, L. 1986. Characterization of the human p53 gene. *Molecular and Cellular Biology*, 6(5), 1379-1385.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. and Kim, Y. H. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments JoVE*, (62); 3923.
- Levine, A. J. and Oren, M. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 9(10), 749–758.
- Li, L., Denq, B., Xing, G., Teng, Y., Tian, C., Chenq, X., Yin, Y., Yanq, J., Gao, X., Zhu, Y., Sun, Q., Zhang, L., Yang, X. and He, F. 2007. PACT is a negative regulator of p53 and essential for cell growth and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 8; 104(19):7951-6.
- Lodish H., Berk, A. and Zipursky, S. L., et al. 2000. Mutations Affecting Genome Stability. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W. H. Freeman; Section 24.5.
- Loughery J. and Meek D. 2013. Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation? *BioDiscovery*, 8: 1.
- Lowe, S.W. 1999. The activation of p53 by oncogenes. *Endocrine-Related Cancer*, 6; 45-48.
- Loyo, M., Li, R. J., Bettegowda, C., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Myers, J. N. and Agrawal, N. 2013. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head and Neck*, 35(3), 454-463.
- Málek, F. 2005. Myelodysplastický syndrom – pohled internisty. *Interní medicína*, 7(2): 65-69.
- McLure, K.G. and Lee, P.W. 1998. How p53 binds DNA as a tetramer. *The EMBO Journal*, 17(12), 3342-3350.
- Moll, U.M. and Peterenko, O. 2003. The MDM2-p53 Interaction. *Pub Med*, 1:1001-1008.
- Nathan, E., Baloglu, C., Pagel, K., Freud, S.M.V., Morgner, N., Robinson, C.V., Fersht, R. and Joerger, A.C. 2011. Interaction of the p53 DNA-Binding Domain with Its N-Terminal Extension Modulates the Stability of the p53 Tetramer. *J Mol Biol*, 10; 409(3): 358-368.
- Newcomb, E.W. 1995. P53 Gene Mutations in Lymphoid Diseases and Their Possible Relevance to Drug Resistance. *Leukemia and Lymphoma*, 17; 3-4.

- Notari, M., Hu, Y., Koch, S., Lu, M., Ratnayaka, I., Zhong, S., Baer, C., Pagotto, A., Goldin, R., Salter, V., Candi, E., Melino, G. and Lu, X. 2011. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of 53 (iASPP) prevents senescence and is required for epithelial stratification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(40): 16645-16650.
- O'Keefe, K., Li, H. and Zhang, Y. 2003. Nucleocytoplasmic Shuttling of p53 Is Essential for MDM2-Mediated Cytoplasmic Degradation but Not Ubiquitination. *Mol Cell Biol*, 23(18): 6396-6405.
- Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. 2010. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001008.
- Oren, M. and Rotter, V. 2010. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2): a001107.
- Panovská, A., Brychtová, Y., Mayer, J. and Doubek, M. 2011. Chronic B-lymphocytic leukemia. *Postgraduální medicína*, 3, 294-301.
- Pavlová, Š., Mayer, J. and Šmardová, J. 2002. Nádorový supresor p53 a leukémie. *Klinická onkologie*, 15(4): 130-135.
- Park, S.T. and Kim, J. 2016. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *International Neurourology Journal*, 20(2), S76-83.
- Parrales, A. and Iwakuma, T. 2015. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 5; 288.
- Pavletich, N. P., Chambers, K. A. and Pabo, C. O. 1993. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*, 7(12B): 2556-64.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P. and Olivier M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 28(6):622-9.
- Reed, S.M., and Quelle, D.E. 2015. p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers*. 7(1): 30-69.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. and Rotter, V. 2011. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes and Cancer*, 2(4), 466-474.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Seifert, H., Mohr, B., Thiede, C., Oelschlägel, U., Schäkel, U., Illmer, T., Soucek, S., Ehninger, G. and Schaich, M. 2009. The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 23, 656-663.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E. and Beach, D. 1997. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell*, v88;i5:p593-602.

- Shetzer, Y., Kagan, S., Koifman, G., Sarig, R., Kogan-Sakin, I., Charni, M., Kaufman, T., Zapatka, M., Molchadsky, A., Rivlin, N., Dinowitz, N., Levin, S., Landan, G., Goldstein, I., Goldfinger, N., Pe'er, D., Radlwimmer, B., Lichter, P., Rotter, V. and Aloni-Grinstein, R. 2014. The onset of p53 loss of heterozygosity is differentially induced in various stem cell types and may involve the loss of either allele. *Cell Death and Differentiation*, 21;1419–1431.
- Shi, D. and Gu, W. 2012. Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity. *Genes and Cancer*, 3(3-4); 240–248.
- Sigmon, J. and Larcom L.L. 1996. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 17(10):1524-7.
- Sionov, R.V., Hayon, I.L. and Haupt, Y. 2013. The Regulation of p53 Growth Suppression. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): *Landes Bioscience*; 2000-2013.
- Solomon, H. 2010. Inactivation of the p53 Tumor Suppressor Gene and Activation of the Ras Oncogene: Cooperative Events in Tumorigenesis. *Discov Med*, 9(48):448-54.
- Staňo Kozubík, K., Malčíková, J., Trbušek, M., Tom, N., Šmardová, J., Doubek, M., Brychtová, Y., Mayer, J., Pospíšilová, Š. and Tichý, B. 2012. „Ultra-deep“ sekvenování identifikuje TP53 mutace před jejich klonální selekcí léčbou u chronické lymfocytární leukémie. *Chem. Listy*, 106; 413-454
- Stavridi, E., Huyen, Y., Sheston, A. and Halazonetis, T.D. 2005. The Three-Dimensional Structure of p53. *Springer*, pp25-52.
- Stellwagen, N. C. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, 30 (1), S188-S195.
- Strano, S., Dell'Orso, S., Di Agostino, S., Fontemaggi, G., Sacchi, A. and Blandino, G. 2007. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*, 26; 2212-2219.
- Špaček, M., Obrtlíková, P. and Trněný, M. 2013. Chronic lymphocytic leukaemia. *Postgraduální medicína*, 5; 520-525.
- Takahashi, K., Patel, K., Bueso-Ramos, C., Zhang, J., Gumbs, C., Jabbour, E., Kadia, T., Andreff, M., Konopleva, M., DiNardo, C., Daver, N., Cortes, J., Estrov, Z., Futreal, M., Kantarjian, H. and Garcia-Manero, G. 2016. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget*, 7(12), 14172-14187.
- Tandom, S., Tudur-Smith, C., Riley, R.D., Boyd, M.T. and Jones, T.M. 2010. A Systematic Review of p53 as a Prognostic Factor of Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Four Main Anatomical Subsites of the Head and Neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(2): 574-587.
- Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm R. and Tjian R. 1995. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, 6;267 (5194):100-4.
- Tsvetkov, P., Reuven, N. and Shaul, Y. 2010. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death and Differentiation*, 17:103-108
- Uldrijan, S., Kotala, V. and Vojtěšek, B. 2002. Regulace stability a aktivity nádorového supresoru p53. *Chem. Listy*, 96;145-149.

Végran, F., Rebucci, M., Chevrier, S., Cadouot, M., Boidot, R. and Lizard-Nacol, S. 2013. Only Missense Mutations Affecting the DNA Binding Domain of P53 Influence Outcomes in Patients with Breast Carcinoma. *PLoS One*, 8(1): e55103.

Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J.2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408; 307-310.

Vondráková, J. 2010. Myelodysplastický syndrom, diagnostika a léčba. *Interní medicína*, 12 (11): 535-539.

Xu, Y., 2003. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death and Differentiation*, 10; 400-403.

Yoshida, Y. 1996. Physician Education: Myelodysplastic Syndrome. *Oncogene*, 1(4):284-287.

Zedan, W., Mourad, M. I., El-Aziz, S. M. A., Salamaa, N.M. and Shalaby, A. A. 2015. Cytogenetic significance of chromosome 17 aberrations and P53 gene mutations as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma. *Diagnostic Pathology*, 10; 2.

Zhang, W., Guo, X. Y., Hu, G. Y., Liu, W. B., Shay, J. W. and Deisseroth, A. B. 1994. A temperature-sensitive mutant of human p53. *The EMBO Journal*, 13(11), 2535-2544.

#### Knižní zdroje:

HOCHOVÁ, Ivana, Radana NEUWIRTOVÁ a Elena VODIČKOVÁ. *Myelodysplastický syndrom: diagnostický atlas*. Praha: Maxdorf, c2006, 323 s. ISBN 8073450887.

KLENER, Pavel. *Klinická onkologie*. Praha: Galén, 2002, xxxvii, 686 s. ISBN 80-7262-151-3.

SNUSTAD, D. Peter, Michael J. SIMMONS a Johann Gregor MENDEL. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ, editor Jiřina RELICHOVÁ, přeložil Jiří DOŠKAŘ. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

#### Internetové zdroje:

Genetics Home Reference. *U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE* [online]. Bethesda [cit. 2016-12-12]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/TP53>

## 9 SEZNAM ZKRATEK

Arg	arginin
B-CLL	B-cell lymphoma leukemia (B-buněčná lymfocytární leukémie)
bp	base pairs (páry bází)
°C	stupně Celsia
CDK	cyklin-dependentní kináza
CLL	chronická lymfocytární leukémie
Cys	cystein
č.	číslo
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DNTPs	deoxynucleotide triphosphates (deoxynukleotid trifosfáty)
E2F	E2 transkripční faktor
et al.	a kolektiv
ethOH	ethanol
FAB	Francouzsko-americko-britská klasifikace
FNOL	fakultní nemocnice Olomouc
G1, S	gap 1, synthesis (G1 fáze a S-fáze buněčného cyklu)
H <sub>2</sub> O	voda
His	histidin
K <sub>3</sub> EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium salt dihydrate (tri draselná sůl kyseliny ethylen-diamino-tetra octové)
kb	kilobáze
kDa	kiloDalton
Leu	leucin
MDM2	human homolog of mouse double minute 2 (lidský homolog myšího genu MDM2)
MDMX	human homolog of mouse double minute 4 (lidský homolog myšího genu MDM4)
MDS	myelodysplastický syndrom
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitr
mM	milimolární
MNC	mononuclear cells (mononukleární buňky)
ng/μl	nanogram na mikrolitr
NGS	next generation sequencing (sekvenování nové generace)
Obr.	obrázek
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pRb	protein retinoblastoma
PRD	proline rich domain (doména bohatá na prolin)
rpm	rotation per minutes (otáčky za minutu)
26S	proteazom 26S
Ser	serin
TP53	tumor supresorový gen kódující protein p53
Tab.	tabulka
TAD	trans-aktivační doména

TAF <sub>II</sub> 40	transkripční faktor
TAF <sub>II</sub> 60	transkripční faktor
TATA	sedminukleotidová sekvence TATAAAA
TBE	tris borát EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolet (ultrafialové světlo)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

## 10 PŘÍLOHY

### Příloha 1: Sekvence primerů

TP53\_5F: CTCTGTCTCCTTCCTCTTCC  
TP53\_5R: GCAATCAGTGAGGAATCAGAGG

TP53\_6F: AGATAGCGATGGTGAGCAGC  
TP53\_6R: ACTGACAACCACCCTTAACC

TP53\_7F: CAGGTCTCCCCAAGGCGCAC  
TP53\_7R: GCAAGCAGAGGCTGGGGCAC

TP53\_8F: GGAGTAGATGGAGCCTGGTT  
TP53\_8R: GTGAATCTGAGGCATAACTG

### Příloha 2: Referenční sekvence dle NM\_000546

EXON 5  
TACTCCCCTGCCCTCAACAAGATGTTTTGCCAACTGGCCAAGACCTGCCCTGTG  
CAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCGCCATGGC  
CATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCCACC  
ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG

EXON 6  
GTCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGT  
ATTTGGATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCG  
CCTGAG

EXON 7  
GTTGGCTCTGACTGTACCACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGC  
ATGGGCGGCATGAACCGGAGGCCATCCTCACCATCATCACACTGGAAGACTC  
CAG

EXON 8  
TGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTTGCGTGTGTTGTGCCTGTCCTGG  
GAGAGACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATCTCCGCAAGAAAGGGGAGCCTCAC  
CACGAGCTGCCCCCAGGGAGCACTAAGCGAG

### Příloha 3: Výstupy sekvencí nukleotidů z webového nástroje BLAST

Výstupy jednotlivých exonů pacientů, u nichž byla nalezena mutace. Zaznamenané změny v nukleotidových sekvencích jsou červeně vyznačeny.

#### Pacient č. 4, 5. exon

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
261 bits(141)	5e-75	143/144(99%)	0/144(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCG	60		
Sbjct 41	AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCG	100		
Query 61	CCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC	120		
Sbjct 101	CCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC	160		
Query 121	ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG	144		
Sbjct 161	ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG	184		

#### Pacient č. 5, 5.exon

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
248 bits(134)	3e-71	136/137(99%)	0/137(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCG	60		
Sbjct 41	AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCG	100		
Query 61	CCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC	120		
Sbjct 101	CCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC	160		
Query 121	ATGAGCGCTGCTCAGAT	137		
Sbjct 161	ATGAGCGCTGCTCAGAT	177		

#### Pacient č. 8, 5.exon

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
261 bits(141)	5e-75	143/144(99%)	0/144(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCG	60		
Sbjct 41	AGACCTGCCCTGTGCAGCTGTGGGTTGATTCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGTCCGCG	100		
Query 61	CCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC	120		
Sbjct 101	CCATGGCCATCTACAAGCAGTCACAGCACATGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACC	160		
Query 121	ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG	144		
Sbjct 161	ATGAGCGCTGCTCAGATAGCGATG	184		



Pacient č. 8, 6.exon

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
204 bits(110)	5e-58	112/113(99%)	0/113(0%)	Plus/Plus
Query 46	GTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGG	105		
Sbjct 1	GTCTGGCCCCCTCCTCAGCATCTTATCCGAGTGGAAGGAAATTTGCGTGTGGAGTATTTGG	60		
Query 106	ATGACAGAAACACTTTTCGGCATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCCTGAG	158		
Sbjct 61	ATGACAGAAACACTTTTCGACATAGTGTGGTGGTGCCCTATGAGCCGCCTGAG	113		