



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

*Analýza mutací v genu  $p53$  pomocí sekvenování*

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ  
LABORANT**

**Autor:** Tereza Buřičová

**Vedoucí práce:** Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2021

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „**Analýza mutací v genu p53 pomocí sekvenování**“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....  
*podpis*

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. Za jeho odborné vedení, trpělivost, cenné rady a věcné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat všem probandům za spolupráci a za jejich přínos pro mou výzkumnou část. Poděkovat musím i Zdravotně sociální fakultě, kde jsem mohla vykonávat praktickou část své práce ve fakultní laboratoři. A nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za trpělivost a podporu.

## *Analýza mutací v genu p53 pomocí sekvenování*

### **Abstrakt**

Úlohou této práce je podrobná literární rešerše k seznámení se s metodikou výzkumné části ve fakultní laboratoři Jihočeské Univerzity na Zdravotně sociální fakultě v Českých Budějovicích. Tumor supresorový gen *TP53* má klíčovou roli při ochraně před nádorovým bujením. Právě tento gen je mutován u více než 50 % maligních nádorů. V první části tato bakalářská práce pojednává o nádorových onemocněních a tumor supresorových genech jako o celku a poté v další části se zaměřuje na výše zmiňovaný tumor supresorový gen *TP53* a mutace v něm.

Praktická část práce se zaměřuje na analýzu mutací na exonu 11. Analýza byla prováděna na třiceti vzorcích, které byly poskytnuty od anonymních probandů. Jednalo se o dvě skupiny probandů. Polovinu vzorků, které jsou označeny čísly od 1–15, poskytli probandí, kteří ve své rodinné anamnéze zaznamenali karcinom. Druhou polovinu tvořily vzorky, popsané písmeny od A–O, od probandů, kteří si nebyli vědomi, že se karcinom v jejich rodině nachází. Tyto vzorky byly izolovány, naamplifikovány pomocí metody PCR a osekvenovány firmou GenSeq s.r.o. v Českých Budějovicích.

Při „okometrickém“ zhodnocení bylo zjištěno, že u vzorků není přítomna ani jedna heterozygotní mutace. Po vložení sekvence do programu NCBI Blast jsem se domnívala, že některé vzorky by mohly obsahovat homozygotní mutaci, nicméně, po řádném přezkoumání bylo zjištěno, že se pouze jedná o špatně čitelnou část sekvence, tedy ani u jednoho zkoumaného vzorku mutace nebyla přítomna.

### **Klíčová slova**

PCR; Sangerovo sekvenování; gen *p53*; mutace; karcinom



## *Analysis of mutations in p53 gene by sequencing*

### **Abstract**

The task of this work is a detailed literature search to get acquainted with the methodology of the research part in the faculty laboratory of the University of South Bohemia at the Faculty of Health and Social Studies in České Budějovice. The tumor suppressor gene *TP53* plays a key role in protection against tumor growth. This gene is mutated in more than 50 % of malignant tumors. In the first part, this bachelor thesis deals with cancer and tumor suppressor genes as a whole, and then in the next part it focuses on the above-mentioned tumor suppressor gene *TP53* and mutations in it.

The practical part of the work focuses on the analysis of mutations in exon 11. The analysis was performed on thirty samples, which were provided by anonymous probands. These were two groups of probands. Half of the samples, which are numbered 1-15, were provided by probands who had a family history of cancer. The other half consisted of samples, described by letters from A to O, from probands who were unaware that the cancer was in their family. These samples were isolated, amplified by PCR and sequenced by GenSeq s.r.o. in České Budějovice.

In the "ocometric" evaluation, it was found that not a single heterozygous mutation was present in the samples. . After inserting the sequence into the NCBI Blast program, I thought that some samples might contain a homozygous mutation. However, after a proper examination, it was found that this was only an illegible part of the sequence. Thus, no mutation was present in any of the examined samples.

### **Key words**

PCR; Sanger sequencing; gene *p53*; mutations, carcinom

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>10</b>
2.1	Obor genetika a onkogenetika	10
2.2	Nádorová onemocnění	10
2.3	Definice a vlastnosti nádorů	11
2.4	Klasifikace nádorů a jejich charakteristika	11
2.4.1	Benigní nádory	12
2.4.2	Maligní nádory	12
2.5	Faktory ovlivňující nádorové bujení	13
2.5.1	Věk a buněčné stárnutí	13
2.5.2	Vliv dědičnosti	13
2.5.3	Faktory vnějšího prostředí	14
2.6	Tumor supresorové geny	14
2.6.1	Obecně o tumor supresorových genech	15
2.6.2	Retinoblastový gen	15
2.6.3	Ostatní tumor supresorové geny	17
2.7	Tumor supresorový gen TP53 a protein p53	17
2.7.1	Historie	18
2.7.2	Struktura genu p53	18
2.7.3	Funkce genu p53	19
2.7.4	Li-Fraumeni syndrom	20
2.7.5	Mutace a delece v genu p 53	20
<b>3</b>	<b>Praktická část</b>	<b>23</b>
3.1	Cíle práce	23
3.2	Informace o pracovišti	23
3.3	Výzkumný materiál	23
3.3.1	Anamnéza respondentů	23
3.4	Použité vybavení a spotřební materiál k provedení výzkumné části	24
3.5	Izolace DNA ze stěru bukální sliznice	25
3.5.1	Reagencie	25
3.5.2	Lýza vzorku	25
3.5.3	Přidání ethanolu	26
3.5.4	Navázání DNA	26
3.5.5	Promývací krok	26
3.5.6	Eluční roztok	27

3.6	Měření koncentrace DNA .....	27
3.7	Navržení primerů .....	28
3.8	PCR (Polymerázová řetězová reakce).....	30
3.8.1	Princip .....	30
3.8.2	Denaturace.....	31
3.8.3	Annealing .....	31
3.8.4	Elongace.....	31
3.8.5	Reagencie .....	31
3.8.6	Pracovní postup.....	32
3.9	Elektroforéza.....	33
3.9.1	Reagencie .....	33
3.9.2	Pracovní postup.....	34
3.10	Čištění PCR produktů za použití Enzymatic PCR cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase .....	35
3.11	Příprava vzorků na sekvenaci.....	35
3.12	Metoda Sangerovo sekvenování .....	35
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>37</b>
4.1	Hodnocení sekvencí .....	37
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Seznam příloh a obrázků .....</b>	<b>51</b>

## Seznam zkratek

DBD	DNA vazebná doména
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECO I	Exonukleáza I
F	Forward primer
LFS	Li-Fraumeniho syndrom
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PRD	Proline Rich Domain, doména bohatá na proliny
R	Reverse primer
RB	Retinoblastom
rSAP	Shrim alkalická fosfatáza
TAD	Transaktivační doména
TBE pufr	Tris – borát – EDTA
TP53	Homo sapiens tumor protein p53
UV	Ultrafialové

# 1 Úvod

Desítky let je známo, že geny nazývané nádorové supresory mají schopnost zabránit nekontrolovatelnému dělení buněk a tím pádem i vzniku nádorů. Jedním z nich je *p53* (*TP53* – Homo sapiens tumor protein p53), který má zásadní roli v maligním procesu.

Mutantní proteiny p53 nejenže ztrácí tumor potlačující aktivitu, ale často získávají další onkogenní funkce, které buňkám poskytují výhody růstu a přežití.

Mutace v genu se vyskytují v různých fázích, což přispívá k rozdílné iniciaci, propagaci, agresivitě a metastázování nádoru. V případě, že dojde k mutaci genu *TP53*, je zároveň narušena i funkce proteinu p53 a následkem je nedostatečná ochrana před vznikem nádorových onemocnění. Mutace genu *TP53* mohou být somatické, které vznikají v průběhu života jedince a nepřenáší se na další generace. Tyto somatické mutace genu *TP53* se vyskytují velmi často a lze je najít až u 50 % všech nádorů. Navzdory obrovské rozmanitosti genů, zapojených do tumorigeneze, vyniká p53 jako klíčový supresor nádoru a hlavní regulátor různých signálních drah zapojených do tohoto procesu. Mnoho rolí p53 jako supresor, zahrnuje schopnost vyvolat zastavení buněčného cyklu, opravu DNA, stárnutí i apoptózu.

Pro jeden z cílů pro teoretickou část této bakalářské práce bylo nutné seznámení se s problematikou daného tématu a vypracování odbornou rešerší. V praktické části bylo cílem osvojit si molekulárně biologické metody, kterými byly izolace DNA z buňkách stěrů, PCR, gelová elektroforéza a příprava vzorků na metodu Sangerova sekvenování a výsledky řádně vyhodnotit.

## 2 Teoretická část

### 2.1 *Obor genetika a onkogenetika*

Genetika je studie o tom, jak se geny a vlastnosti předávají z jedné generace na druhou. Naše geny nesou informace, které ovlivňují naše zdraví, náš vzhled, a dokonce i naši osobnost. Genetika jako vědní disciplína vycházela z práce Gregora Mendela v polovině 19. století. Mendel měl podezření, že vlastnosti se dědí jako samostatné jednotky, a přestože v té době nevěděl nic o fyzikální nebo chemické povaze genů, jeho jednotky se staly základem pro rozvoj současného chápání dědičnosti. Veškerý současný výzkum v genetice lze vysledovat až k Mendelovu objevu zákonů, jimiž se řídí dědičnost vlastností (Winchester, 2020)

Vědní obor genetika, respektive podobor onkogenetika, zkoumá geny a různé cesty, které řídí vývoj právě rakoviny. Používá se několik postupů, včetně analýzy genomů pacientů s rakovinou a s nádory, pro identifikaci postižených genů. Tyto studie se provádějí v kombinaci s experimenty na modelech in vitro a in vivo za účelem dešifrování mechanismů, které řídí tumorigenezi. Zde se diskutuje o tom, jak se tyto postupy, dokážou použít k lepšímu pochopení toho, jak se rakovina tvoří. Cílem onkogenetiky je katalogizovat a porozumět genetickým změnám, které přispívají k rozvoji rakoviny. Genetici se zaměřují na identifikaci onkogenů, což jsou geny, které po mutaci přispívají k rozvoji rakoviny podporou růstu nádorových buněk a tím, že rakovinné buňce udělují schopnost vyhnout se buněčnému cyklu a kontrolním bodům buněčné smrti, které by za normálních okolností kontrolovaly jejich růst (Townsend, 2022)

### 2.2 *Nádorová onemocnění*

Nádorové onemocnění tedy rakovina je diagnózou, která děsí bez výjimky každého. Nádorové onemocnění můžeme definovat jako chorobu, která je způsobena neomezeným růstem nádorových buněk tkání, které ztratily nebo mají poškozený mechanismus kontrolující růst buněk. V současné době je rakovina jedno z nejdiskutovanějších a nejrozšířenějších onemocnění, se kterým se dle statistik potýká každý 3. člověk. Úspěšnost léčby rakoviny závisí na jejím včasném zahájení. V posledních letech dochází k velkému pokroku nejen v diagnostických metodách, které odhalí i rané stádium a

zvyšují tak šance na přežití, ale i ve způsobech léčby s minimálními nežádoucími účinky (Penoxal Trade Inc., © 2004–2021).

Rakovina je způsobena změnami (mutacemi) DNA v buňkách. DNA uvnitř buňky je „zabalena“ do velkého počtu jednotlivých genů, z nichž každý obsahuje sadu instrukcí, které buňce říkají, jaké funkce má vykonávat, a také jak růst a dělit se. Chyby v těchto pokynech mohou způsobit to, že buňka zastaví svou normální funkci a může umožnit, aby se buňka stala nádorovou. Výskyt rakoviny dramaticky stoupá s věkem, s největší pravděpodobností v důsledku nahromadění rizik pro konkrétní druhy karcinomu, která se zvyšují s věkem. Celková akumulace rizika je kombinována s tendencí k tomu, že buněčné opravné mechanismy jsou s přibývajícím věkem méně účinné (WHO, 2022).

### **2.3 Definice a vlastnosti nádorů**

Nádor, jinými slovy - tumor, neoplasma, novotvar, blastom, je soubor abnormálních buněk, které rostou nezávisle na organismu i když příčina vzniku již nepůsobí. Z biologického hlediska se nádorové buňky od zdravých liší větší schopností se množit a růst vyšší odolností a delší životaschopností a tím nabývají převahu nad zdravými buňkami. Nádory se projevují morfoloickou odlišností – nahromadění nádorových buněk způsobí, že postižené orgány jsou zvětšené a jejich tvar je změněn. Jinou morfoloickou odchylkou může být i změna barvy. Z funkčního hlediska nádory neplní žádnou užitečnou funkci. Jen vzácně zůstávají funkčně bezvýznamné, např. mateřská znaménka. Obvykle při svém růstu narušují funkce orgánů (obstrukce, tlaková atrofie, snížení produkce hormonu, snížení krvetvorby) (Bezděková, 2011).

### **2.4 Klasifikace nádorů a jejich charakteristika**

Z biologického pohledu si můžeme nádory rozdělit na dvě skupiny, a to na nepravé nádory a nádory pravé. Mezi nepravé neboli pseudotumory řadíme atypicky probíhající progresivní změny jako je hypertrofie či hyperplazie. Makroskopicky nádor připomínají, avšak mikroskopicky nikoliv. Mezi pravé nádory řadíme benigní nádory a maligní nádory (Beneš, 2007).

### 2.4.1 *Benigní nádory*

Neboli nádory nezahubné, mají většinou ostré a jasné okraje, neprorůstají do okolní tkáně a netvoří metastázy. Benigní nádory však mohou být velmi nebezpečné, vyvíjí-li tlak na okolní cévy či nervy. Ve většině případů ale benigní nádory nejsou zdaleka tak nebezpečné, proto někdy léčbu v podobě chirurgického zákroku potřebují a jindy nikoliv. Příčina benigních nádorů je většinou neznámá, avšak růst benigních nádorů může souviset se špatným životním stylem, stresem, nebo je na vině genetika (Stuart, 2021).

Existuje mnoho typů benigních nádorů:

- Adenom – Nezahubný nádor, který vychází ze žlázo­vého epitelu. Běžným typem adenomu je polyp v tlustém střevě. Adenomy mohou také růst v játrech nebo nadledvinách, hypofýze nebo štítné žláze.
- Fibrom – Nejčastější benigní mesenchymální nádor měkkých tkání dutiny ústní a na těle se tvoří z pojivové tkáně.
- Myom – Hormonálně závislý nádor, který vyrůstá ze stěny svaloviny nitrobřišních orgánů (Stuart, 2021).

### 2.4.2 *Maligní nádory*

Neboli nádory zhoubné, jsou velmi těžko léčitelné, pokud se onemocnění nepodchytí včas, vytvoří se metastázy po celém těle, nádory je pak obtížné odstranit. V případě, že se onemocnění vůbec neléčí, rakovina svého nositele zahubí – proto zhoubný nádor. Jedinou funkcí maligního nádoru je se rozmnožit a napadnout, co nejvíce buněk, sám o sobě tedy nikdy nebolí – bolest způsobuje jeho expanze do okolních tkání, poškození jejich funkce a jich samotných (Chytře na život, 2009–2022).

Naše těla neustále produkují nové buňky, které nahrazují staré. Někdy se při tomto procesu DNA poškodí, tím pádem se nové buňky vyvíjejí abnormálně. Místo odumírání se nadále množí rychleji, než zvládne imunitní systém, a vytvoří se nádor. Rakovinné buňky se dále mohou odtrhnout od nádorů a putovat krevním řečištěm nebo lymfatickým systémem do jiných částí těla (Pietrangelo, 2019).

Mezi typy maligních nádorů patří:

- Karcinom – Zhoubný nádor vznikající z epitelu zahrnující např. adenokarcinom, jež se podílí na rakovině prsu, tlustého střeva či prostaty.



- Sarkom – Zhoubný nádor vyvíjející se z pojivových tkání a vznikají z mezenchymových buněk, které za normální situace diferencují ve svalovou nebo tukovou tkáň, v cévu, kost či chrupavku (Pietrangelo, 2019).

*Tabulka 1: Klíčové rozdíly mezi benigní a maligní nádory (zdroj: Pietrangelo, 2019)*

Benigní nádory	Maligní nádory
Neprorůstá do okolní tkáně	Dokáže prorůstat do okolní tkáně
Nemůže se rozšířit do jiné části těla	Může uvolnit buňky, které putují krevním řečištěm nebo lymfatickým systémem do jiných částí těla a tam tvořit nádor
Po odstranění se nevracejí	Po odstranění se může vrátit
Obvykle hladký a pravidelný tvar	Může mít nejasné okraje a nepravidelný tvar
Při dotyku je pod kůží často pohyblivý	Při dotyku je pod kůží pevně na místě
Neohrožuje život	Může být pro život ohrožující
Může či nemusí vyžadovat léčbu	Léčba je vyžadována

## **2.5 Faktory ovlivňující nádorové bujení**

Nádorové buňky se od zdravých liší svými vlastnostmi, které jsou následkem genetických změn u nádorových buněk. Genetické změny buněk mohou být vyvolávány různými faktory.

### **2.5.1 Věk a buněčné stárnutí**

Nádorová onemocnění jsou nejčastější příčinou úmrtí ve vyšším věku. S věkem přibývá množství nádorů, v závislosti na genetických mutacích, úbytku funkce a změny struktury tkání. Větší výskyt nádorových onemocnění ve vyšších věkových skupinách souvisí s delším časovým obdobím působení kancerogenních (rakovinotvorných) faktorů. Čím déle působí tyto rakovinotvorné faktory, tím narůstá pravděpodobnost, že dojde k poruše informačního centra buňky. Zdravé buňky stárnoucího organismu nejsou schopny se opakovaným útokům bránit a tyto změny opravit. Ztráta a narušení kontrolního systému buněk vede ke vzniku nádorového bujení (Petruželka, 2007).

### **2.5.2 Vliv dědičnosti**

Každý typ nádorového onemocnění se může vyskytovat dědičně i sporadicky.

Asi 5-10 % nádorů může mít dědičnou příčinu. Jedná se například o mutaci genů BRCA -1 nebo BRCA-2, které zodpovídají za rakovinu prsu či vaječnicků. Každý typ nádorového onemocnění je zapříčiněn poškozením genů a může se vyskytovat dědičně i sporadicky. Pokud je z předchozí generace chyba v genech a nádor v raném věku vzniká, mluvíme o dědičné predispozici k nádoru. Některé mutace genů mohou také způsobit vzácné nádory – dětské nádory oka (retinoblastom), dětské nádory ledviny (Wilmsův nádor), familiární adenomatózní polypózu s tvorbou mnohočetných polypů v tlustém střevě nebo Li-Fraumeniho syndrom. Mnoho lidí, kteří onemocní rakovinou prsu, vaječnicků nebo tlustého střeva, nemá dědičnou formu a zárodečnou mutaci v důležitých genech. Dokonce i pokud se v rodině vyskytlo více příbuzných se stejným onemocněním, může to být stále dílem náhody, nikoliv dědičnosti. Mnohé nádory jsou v populaci tak časté, že je pravděpodobné, že se mohou v rodinách opakovat, obzvláště při podobném způsobu života. Pokud se nádor objeví až ve vyšším věku, nejspíše bývá způsoben náhodně získanou mutací (Foretová, 2021).

### 2.5.3 Faktory vnějšího prostředí

Faktory vnějšího prostředí jsou nejčastější příčinou nádorového bujení. Mezi tyto faktory můžeme řadit nesprávný životní styl, působení chemických karcinogenů nebo ionizujícího záření, ale i hormonální stimulaci.

### 2.6 Tumor supresorové geny

Jak již název napovídá, tumor – supresorové geny potlačují vznik nádorového onemocnění. Jejich prvotní funkcí je tedy regulace buněčného cyklu, čímž zabraňují, aby se buňka začala nekontrolovaně dělit. Na rozdíl od onkogenů, musí být obě kopie tumor – supresorového genu v buňce vyřazeny z funkce (proto se můžeme také setkat s označením – recesivní onkogeny), aby mohlo dojít k procesu maligní transformace (Šípek, 2010-2014).

Tabulka 2: Seznam nejznámějších tumor supresorových genů, (zdroj: Cooper, 2000)

Gen	Typ rakoviny
APC	Rakovina střev
BRCA1	Rakovina prsu a vaječnicků
BRCA2	Rakovina prsu

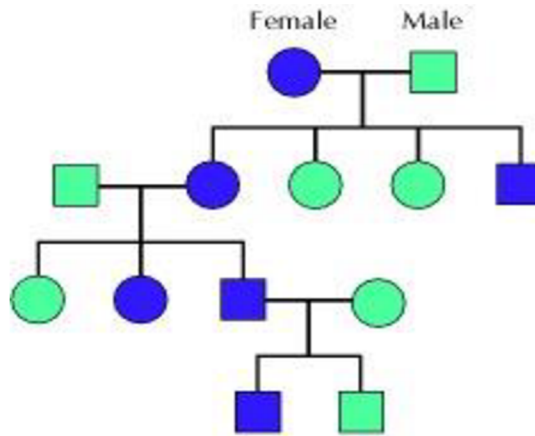
<b>DPC4</b>	Rakovina slinivky
<b>INK4</b>	Rakovina plic, melanom, nádory mozku, leukémie
<b>MADR2</b>	Rakovina střev
<b>NF1</b>	Neurofibrosarkom
<b>NF2</b>	Meningiom
<b>P53</b>	Nádory mozku, prsu, plic, jater, leukémie
<b>PTC</b>	Bazocelulární karcinom
<b>PTEN</b>	Nádory mozku, prostaty, ledvin, melanom, rakovina plic
<b>Rb</b>	Retinoblastom,
<b>WHL</b>	Rakovina ledvin
<b>WT1</b>	Wilmsův tumor

### **2.6.1 Obecně o tumor supresorových genech**

Mutace v tumor supresorových genech mají recesivní charakter, proto je nacházíme hlavně u familiárních syndromů, kdy si jedinec nese od početí jednu vadnou alelu a stačí mu už pak jen poškodit alelu druhou a vzniká problém. V každé somatické buňce je zhruba 40 tumor supresorových genů. Aby se staly rakovinotvornými, musí být mutovány obě jejich alely – proto také nesou název recesivní onkogeny. Na rozdíl od mnohem častějšího sporadického retinoblastomu, kde se jedná o náhodné mutace jedné a posléze druhé alely v buňce sítnice, je u hereditární formy jedna mutovaná alela zděděna. Příslušný jedinec je heterozygot, u něhož se zděděná nádorová predispozice zatím neprojevuje. Dojde-li však k mutaci/eliminaci druhé alely, iniciuje se rozvoj nádorového klonu buněk sítnice (Šípek, 2014).

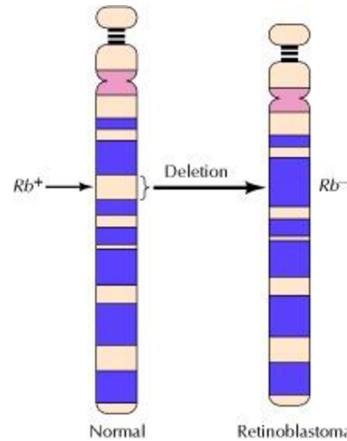
### **2.6.2 Retinoblastový gen**

Prvně objevený tumor supresorový gen byl nazván retinoblastomový gen (RB1 gen) a jeho produkt RB-protein (pRB). Vyskytuje se v každé buňce, kde reguluje buněčný cyklus dělení. RB gen byl identifikován při studiích retinoblastomu, což je dětský vzácný syndrom oka. Za předpokladu, že je onemocnění detekováno včas, lze retinoblastom úspěšně léčit a mnoho pacientů přežije. V důsledku studií, bylo zjištěno, že některé případy retinoblastomu mohou být dědičné a v 50 % těchto případů, se u dětí postižených rodičů vyvine retinoblastom (Cooper, 2000).



Obrázek 1: Dědičnost retinoblastomu. Postižení a normální jednotlivci jsou označeni fialovými a zelenými symboly (zdroj: Cooper,2000).

Funkční povaha genu Rb jako negativního regulátoru tumorigeneze byla původně indikována pozorováním morfologie chromozomů. U některých retinoblastomů byly nalezeny viditelné delece chromozomu 13q14, což naznačuje, že ztráta (nikoli aktivace) genu Rb vedla k rozvoji nádoru (Cooper, 2000).



Obrázek 2: Delece Rb v retinoblastomu. Mnoho retinoblastomů má delece chromozomálního lokusu (13q14), který obsahuje gen Rb (zdroj: Cooper,2000)

Přestože byl Rb identifikován u vzácných dětských nádorových onemocnění, podílí se také na některých běžnějších nádorech dospělých. Studie klonovaného genu zejména prokázaly, že Rb je ztracen nebo inaktivován u mnoha karcinomů močového měchýře, prsu a plic. Charakterizace Rb jako tumor supresorového genu sloužila jako prototyp pro identifikaci dalších tumor supresorových genů, které přispívají k rozvoji mnoha různých lidských rakovin. Některé z těchto genů byly identifikovány jako příčiny vzácných

dědičných rakovin, které hrají roli podobnou Rb v dědičném retinoblastomu. Jiné geny potlačující nádor byly identifikovány jako geny, které jsou často deletovány nebo mutovány v běžných neinheritovaných rakovinách dospělých, jako je karcinom tlustého střeva. V obou případech se zdá, že většina nádorových supresorových genů se podílí na vzniku zděděných i neinicitovaných forem rakoviny. Skutečně se zdá, že mutace některých nádorových supresorových genů jsou nejčastějšími molekulárními změnami vedoucími k vývoji lidského nádoru (Cooper, 2000).

### **2.6.3 Ostatní tumor supresorové geny**

Druhým identifikovaným tumor supresorovým genem je *p53*, který je často inaktivován u celé řady lidských rakovin, včetně leukémií, lymfomů, sarkomů, mozkových nádorů a karcinomů mnoha tkání, včetně prsu, tlustého střeva a plic. Stejně jako *p53* jsou geny potlačující nádor *INK4* a *PTEN* velmi často mutovány v několika běžných rakovinách, včetně rakoviny plic, rakoviny prostaty a melanomu. U rakoviny tlustého střeva jsou často odstraněny nebo mutovány dva další tumor supresorové geny *APC* a *MADR2*. Zděděné mutace dalších dvou tumor supresorových genů, *BRCA1* a *BRCA2*, jsou zodpovědné za dědičné případy rakoviny prsu, které představují 5 až 10 % z celkového výskytu rakoviny prsu. Další tumor supresorové geny se podílejí na vývoji mozkových nádorů, rakoviny pankreatu a bazocelulárních kožních karcinomů, stejně jako u několika vzácných dědičných rakovinných syndromů, jako je Wilmsův nádor. Počet identifikovaných nádorových supresorových genů se rychle rozšiřuje a charakterizace těchto genů zůstává aktivní oblastí výzkumu rakoviny (Cooper, 2000).

### **2.7 Tumor supresorový gen TP53 a protein p53**

Gen *TP53* je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17, konkrétně se jedná o lokus 17p13.1. Jeho 11 exonů a 20 intronů celkem kóduje 393 aminokyselin. Tumor supresorový protein p53 je lokalizován v jádru buněk po úplném těle, kde se váže přímo na DNA. Většina buněčných procesů řízených p53 závisí na jeho schopnosti aktivovat transkripci cílových genů. Pro účinnou aktivaci transkripce je nutné, aby vznikl tetramer p53 (Strachan and Read, 1999).

Obecně gen *TP53* funguje jako transkripční faktor, který je stabilizován a aktivován různými genotoxickými a buněčnými stresovými signály, jako je poškození DNA, hypoxie, aktivace onkogenu a deprivace živin, což následně vede k zastavení buněčného cyklu, apoptóze, stárnutí a metabolické adaptaci (Curr Drug Targets, 2014).

### 2.7.1 Historie

Před několika desítkami let, přesněji v roce 1979, čtyři laboratoře v Londýně, odhalily existenci proteinu p53. Všichni, kteří na tomto vědeckém výzkumu pracovali, každý s jiným experimentálním postupem, dospěli k závěru. Byl nalezen protein p53 v transformovaných buňkách v komplexu s T – antigenem SV40 (Simian Virus 40). Zpočátku se zdálo, že jde o onkogen, kvůli jeho vysoké expresi v nádorových tkáních, avšak v těchto počátečních studiích byla pro výzkum použita cDNA (complementary DNA) s mutovanou formou p53. V roce 1989 se ukázalo, že mutace v klonech cDNA p53 vedly k buněčné transformaci a protein p53 bránil transformaci a fungoval jako supresor nádoru. Od roku 1989 byl *p53* označován jako tumor supresorový gen, který zabraňuje rakovině (Weinberg, 2019).

### 2.7.2 Struktura genu *p53*

Před pár lety byly objeveny dva geny, které se řadí do takzvané „rodiny p53“. Jedná se o geny *p63* a *p73*, které nejen že se mohou vázat na vazebná místa DNA p53, ale jsou si s genem *TP53* i strukturně velmi podobné (Genes Dev. 2005).

*TP53*, který obsahuje 393 aminokyselin a lze jej rozdělit do několika funkčních domén. Jedná se o N – koncovou doménu, centrální doménu a C – koncovou doménu (Chène, 2001).

Na obou koncových doménách probíhají posttranslační úpravy proteinu, jako jsou acetylace a fosforylace (Biochem. J., 2000).

Gen *p53*, stejně jako geny *p73* a *p63*, obsahuje vnitřní promotor a může přepisovat šest různých mRNA v normální lidské tkáni, které mohou kódovat alespoň šest izoform proteinu p53 (Genes Dev. 2005).

### 2.7.2.1 *N – koncová doména*

Název N – koncová doména je označení pro konec proteinu, který končí aminovou skupinou.

Tato doména obsahuje další dvě domény:

- Transaktivační doména (TAD – Transactivation Domain, aa 1–43)
- Doména bohatá na prolíny (PRD – Proline Rich Domain, aa 61–94) (Biochem. J. 2000; Alberts, et al., 2002)

### 2.7.2.2 *Centrální doména*

DBD (aa 110–286) – DNA vazebná doména

Zhruba 80-90 % všech mutací genu je koncentrováno do této domény, přičemž se zde nachází několik „hot spot“ míst. Tyto mutace významně zvyšují nádorový potenciál buněk kvůli nezpůsobivosti p53 vázat se na cílovou DNA (Biochem. J. 2000; Holčáková 2008).

### 2.7.2.3 *C – koncová doména*

Název C – koncová doména je označení pro konec proteinu, který končí karboxylovou skupinou.

Tato doména dále obsahuje dvě domény:

- 4D, OD, OLD (aa – 326 – 355) – tetramerizační doména
- regulační doména (aa 363–393)

Tetramerizační doména neboli oligomerizační doména, umožní uspořádání tohoto proteinu do čtyř molekul p53 tetrameru, a je nepostradatelná pro protein – proteinové interakce, posttranslační modifikace, zánik p53 a pro navázání DNA (Biochem. J. 2000).

Tato doména umožňuje vytváření tetramerů p53 a dalších oligomerů, důležitých pro správný chod p53 (Holčáková, 2008).

## 2.7.3 *Funkce genu p53*

Gen *p53* bývá často označován jako „strážce genomu“ a to díky své ochranné funkci. Během buněčného cyklu má na starost přenos neporušené genetické informace (Šimečková, 2011).

Protein p53 se řadí do takzvané „proteinové rodiny“, která pojímá v první řadě p53 a dále se jedná o p63 a p73. Tyto 3 proteiny si jsou velmi podobné, co se týká struktury a

funkcí. Zdá se, že p53 u vyšších organismů brání rozvoji nádorů, zatímco p63 a p73 se uplatňují v normálním vývoji.

#### **2.7.4 Li-Fraumeni syndrom**

Li-Fraumeniho syndrom nese jméno podle amerických lékařů, kteří právě tento syndrom objevili. Jednalo se o Dr. Fredericka Pei Li a Dr. Josepha F. Fraumeni jr. Tito dva lékaři syndrom poprvé popsali v roce 1969 na Národním onkologickém institutu.

Li-Fraumeni syndrom (LFS) je dědičná familiární predispozice k širokému spektru určitých, často vzácných, karcinomů. To je způsobeno změnou (mutací) v tumor supresorovém genu *TP53*. Výsledný protein p53 produkovaný genem je poškozen nebo jistým způsobem znefunkčnen a není schopen zabránit vzniku maligních nádorů. Děti a mladí dospělí jsou náchylní k rozvoji několika různých druhů karcinomu, zejména sarkomů měkkých tkání a kostí, rakoviny prsu, mozkových nádorů, adrenokortikálního karcinomu a akutní leukémie. Další rakoviny pozorované u pacientů s LFS zahrnují rakovinu gastrointestinálního traktu a rakovinu plic, ledvin, štítné žlázy a kůže, stejně jako v gonadálních orgánech (vaječnících, varlat a prostaty). Je důležité si uvědomit, že ne u každého s mutací genu *TP53* se nutně vyvine rakovina, ale rizika jsou podstatně vyšší než u běžné populace. Diagnóza LFS je kriticky důležitá, aby postižené rodiny mohly vyhledat vhodné genetické poradenství a také dohled pro včasnou detekci karcinomu (ASCO, 2005-2022).

#### **2.7.5 Mutace a delece v genu p 53**

Protein p53 za určitých fyziologických podmínek, prostřednictvím svých cílových genů zprostředkovává adekvátní reakci buňky na nejrůznější typy stresu, jako je například poškození DNA, nedostatek kyslíku, hladovění. Tento protein zastaví buněčný cyklus, zahájí mechanismy opravující DNA, či vyvolá programovanou buněčnou smrt, která zničí nehodící se buňky. Mutace genu *TP53* narušují funkci tohoto proteinu a následkem je tedy nedostatečná ochrana před vznikem nádorových onemocnění. Díky tomu je gen *TP53* zásadním nádorovým supresorem, který značně chrání buňku před nádorovým onemocněním (Šmardová, Koptíková, 2014).



### **2.7.5.1 Inaktivace proteinu p53**

Inaktivace tumor-supresorových genů je jedním z klíčových charakteristických znaků tumoru. Inaktivace u proteinu p53 se zcela liší od inaktivace jiných nádorových supresorů (Strano, et. al., 2007).

Na rozdíl od jiných tumor-supresorových genů je *TP53* inaktivován missense mutacemi, tedy takovými mutacemi v genetickém kódu, kdy důsledkem je transformace struktury polypeptidového vlákna, u poloviny všech lidských rakovin. Pouze jediná izolovaná missense mutace může být příčinou vážné destrukce struktury tohoto proteinu a narušit fyziologické funkce v těle (Štefánek, 2011).

U jiných tumor-supresorových genů inaktivace způsobuje syntézu proteinu v nekompletní podobě, nebo úplnou ztrátu proteinu (Strano, et al., 2007).

### **2.7.5.2 Čestnost, výskyt a typy mutací proteinu p53**

Mutace genu *TP53* byly zjištěny u téměř 50 % lidí, trpících onkologickým onemocněním. Tyto genové aberace jsou většinou mutace missense, lokalizované převážně v DNA – vazebné doméně, a zde ztrácí schopnost vázání se na DNA (Šmardová, et. al., 2005).

### **2.7.5.3 Somatické mutace TP53**

Většina všech mutací genu *TP53* jsou mutace somatické. Somatické mutace jsou působeny nahodilým vznikem chyb postupem života v některých genech v určité buňce. Když dojde u buňky k nekontrolovanému dělení, dochází k nahromadění zmutovaných buněk, vzniku rakoviny a také často dochází k metastázování do odlehlejších částí těla. Většina těchto somatických mutací jsou tzv. missense mutace neboli bodové mutace v DNA-vazebné doméně. Somatické mutace zasahují tkáň a orgány, do potomstva se nepřenašejí (Petitjea, et. al, 2007).

### **2.7.5.4 Zárodečné mutace TP53**

Na rozdíl od somatických mutací, pokud je mutace genu *TP53* přenesena pohlavními buňkami na potomka a je přítomna ve všech jeho buňkách, načež se jedná o

zárodečnou mutaci *TP53*. Takto postižení jednotlivci mají dědičnou predispozici k nádorům způsobeným mutovaným *TP53* (Petitjea, et. al, 2007).

### 3 Praktická část

#### 3.1 Cíle práce

- 1) Optimalizace metody PCR pro amplifikaci určitého úseku genu *TP53*
- 2) Sekvenování daného úseku genu *TP53* u skupin jedinců s karcinomem v rodinné anamnéze a u kontrolní skupiny
- 3) Analýza a zpracování sekvenačních dat

#### 3.2 Informace o pracovišti

Praktická část mé bakalářské práce byla provedena v laboratoři na Zdravotně sociální fakultě Jihočeské univerzity Českých Budějovicích, J. Boreckého 1167/27, 370 11 České Budějovice pod odborným vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph. D.

#### 3.3 Výzkumný materiál

Cílem práce byla optimalizace metody PCR k vyšetření genu *TP53* a zjištění zastoupení patogenních mutací v analyzovaném úseku genu *TP53* u jedinců s karcinomem v rodinné anamnéze. K vyšetření jsme měla k dispozici vzorky DNA, které jsem izolovala z buklálních stěrů od skupiny respondentů se záznamem karcinomu v rodinné anamnéze a od kontrolní skupiny respondentů bez záznamu karcinomu v rodinné anamnéze.

##### 3.3.1 Anamnéza respondentů

##### 3.3.1.1 Skupina respondentů s karcinomem v rodině

Tabulka 3: Přehledný seznam anamnéz probandů (zdroj: vlastní)

	Anamnéza respondenta
1.	Žena 41 let, prarodiče úmrtí na karcinom plic, matky sestra úmrtí na karcinom děložního čípku
2.	Žena, 63 let, sestra úmrtí na karcinom děložního čípku, rodiče úmrtí na karcinom plic. Ona sama má šesti násobek nádorových markerů.

3.	Žena, 34 let, sestra a matka karcinom štítné žlázy, babička karcinom děložního čípku a myomy
4.	Žena, 21 let, praprarodiče úmrtí na rakovinu plic a malobuněčný karcinom plic
5.	Muž, 65 let, rodiče úmrtí na, pro něj neznámý, karcinom
6.	Muž, 37 let, otec úmrtí na karcinom slinivky, matka karcinom děložního čípku, dědeček úmrtí na leukémii
7.	Žena, 31 let, otec melanom, babička úmrtí na karcinom prsu
8.	Muž, 40 let, dědeček úmrtí na karcinom tlustého střeva
9.	Žena, 21 let, dědeček úmrtí na karcinom hlasivek, následné metastázování do celého hrudníku
10.	Žena, 21 let, otec zhoubný melanom
11.	Žena, 22 let, otec a bratr zhoubný melanom
12.	Muž, 33 let, karcinom rtu
13.	Žena, 22 let, babička úmrtí na mozkové metastázy
14.	Žena, 23 let, dědeček úmrtí na nádor tlustého střeva a konečníku
15.	Muž, 42 let, otec nádor jícnu

### 3.3.1.2 *Kontrolní skupina*

Kontrolní skupina se skládá z 15 ti respondentů, kteří nejsou obeznámeni s tím, že by v jeho rodinné anamnéze byl záznam karcinomu.

### 3.4 *Použité vybavení a spotřební materiál k provedení výzkumné části*

- Automatické mikropipety
- Minicentrifuga
- Vortex mixer
- Stojánky na zkumavky a mikrozkušavky
- Rukavice
- Špičky na automatické mikropipety
- Laboratorní termostat
- Termocykler MJ Mini Gradient Thermal Cycler, BIO–RAD

- Laboratorní předvážky
- Mikrovlnná trouba
- Elektroforetická vana (Major Sciences)
- UVIsave HD5 Uvitec Cambridge

### 3.5 *Izolace DNA ze stěru bukální sliznice*

Izolaci DNA jsem provedla z bukálních stěrů, tedy z vnitřní strany tváře. Vzorky jsem odebrala respondentům, kteří byli ochotni a souhlasili s vyšetřením genu *TP53* pro praktickou část této bakalářské práce. Výsledky respondentů budou bezvýhradně anonymní a nebudou s nimi obeznámeni, jelikož tato laboratoř nemá právo výsledky kdekoliv prezentovat. K izolaci DNA z odebraného vzorku jsem použila komerční sadu pro izolaci DNA z tělních tekutin od firmy Generi Biotech.

Vhodný typ materiálu: Stěr bukální sliznice

Dříve než jsem začala:

- Nastavila jsem si laboratorní termostat na 70 °C
- Předehřála jsem si Elution Buffer BL4 na 70 °C
- Měla jsem k dispozici 200 µl PBS roztoku na každý vzorek

#### 3.5.1 *Reagencie*

- Buffer BL1
- Wash Buffer BL 2
- Wash Buffer BL 3
- Wash Buffer BL 4 (eluční)
- PBS
- Proteináza K
- Ethanol 96%

#### 3.5.2 *Lýza vzorku*

- stěrový materiál se vzorkem stěru bukální sliznice jsem umístila do 2ml zkumavky, která není součástí kitu.

- přidala jsem 200 µl deionizované vody, 200 µl Buffer BL1 a 25 µl Proteinázy K
- řádně jsem promíchala na vortexu (20 s)
- inkubovala jsem v termostatu při 70 °C / 15 min
- před otevřením bylo nutné vzorek promíchat a krátce stočit (3000 x g, 5 s)
- vzorek jsem přenesla do nové 1,5ml zkumavky, která není součástí kitu a odstranila jsem stěrový materiál

### **3.5.3 Přidání ethanolu**

- přidala jsem 210 µl ethanolu (96 %)
- promíchala jsem na vortexu a krátce stočila (3000 x g, 5 s)

### **3.5.4 Navázání DNA**

- pro každý vzorek jsem si z izolačního kitu připravila jednu kolonku a dvě sběrné zkumavky pro promývací kroky
- na kolonku umístěnou ve 2ml sběrné zkumavce jsem přepipetovala 600 µl vzorku
- centrifugovala jsem 1 min / 11 000 x g
- sběrnou zkumavku s filtrátem jsem odstranila a kolonku vložila do nové sběrné zkumavky

### **3.5.5 Promývací krok**

- na kolonku jsem napipetovala 500 µl Buffer BL2
- centrifugovala jsem 1 min / 11 000 x g
- tekutina ze sběrné zkumavky jsem vylila a kolonku vložila zpět do sběrné zkumavky
- na kolonku jsem napipetovala 600 µl Wash Buffer BL3
- centrifugovala jsem 2 min / 11 000 x g
- sběrnou zkumavku s filtrátem jsem odstranila a kolonku vložila do nové označené 1,5 ml zkumavky, která není součástí izolačního kitu

### 3.5.6 Eluční roztok

- přímo na střed kolonky jsem napipetovala 30  $\mu$ l přehřátého Buffer BL4 (70 °C)
  - Pozn.: Objem Buffer BL 4 jsem snížila ze 100  $\mu$ l na 30  $\mu$ l za účelem snížení koncentrace DNA
- inkubovala jsem 1 min při laboratorní teplotě
- centrifugovala jsem 1 min / 11 000 x g
- odstranila jsem kolonku
- čistá genomová DNA již byla připravena k dalšímu použití

(Generi Biotech, 2015)

### 3.6 Měření koncentrace DNA

Pro další práci s naizolovanou DNA je nutné změřit její koncentraci. Koncentraci DNA jsem měřila na přístroji Colibri Microvolume Spectrometer. Měřila jsem 1  $\mu$ l vzorku DNA proti 1  $\mu$ l Buffer BL 4 roztoku.

*Tabulka 4: Přehledný seznam naměřených koncentrací izolovaných DNA (zdroj: vlastní)*

Měření koncentrace DNA u skupiny respondentů s karcinomem v anamnéze			
Označení vzorku	1. Koncentrace DNA [ng/ $\mu$ l]	2. Koncentrace DNA [ng/ $\mu$ l]	Aritmetický průměr
vz. 1	58,12	56,66	57,39
vz. 2	74,24	74,34	74,29
vz. 3	12,76	10,52	11,64
vz. 4	51,55	52,36	51,955
vz. 5	37,11	37,24	37,175
vz. 6	85,94	81,47	83,705
vz. 7	45,13	45,67	45,4
vz. 8	41,09	46,09	43,59
vz. 9	21,46	19,38	20,42
vz. 10	54,22	59,63	56,93

vz. 11	22,96	22,38	22,67
vz. 12	30,10	29,83	29,97
vz. 13	83,98	83,14	83,56
vz. 14	57,13	54,87	56
vz. 15	40,33	39,24	39,785

Tabulka 5: Přehledný seznam naměřených koncentrací izolovaných DNA (zdroj: vlastní)

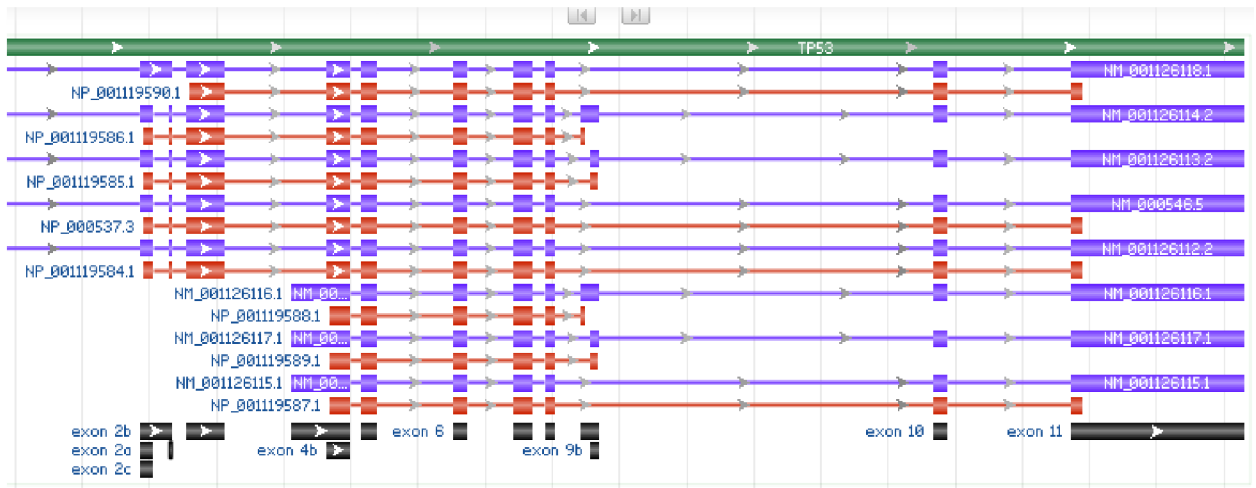
Měření koncentrace DNA u kontrolní skupiny			
Označení vzorku	1. Koncentrace DNA [ng/μl]	2. Koncentrace DNA [ng/μl]	Aritmetický průměr
vz. A	45,07	44,50	44,79
vz. B	92,45	91,93	92,18
vz. C	22,38	19,78	21,08
vz. D	19,03	24,32	21,68
vz. E	39,01	42,17	40,59
vz. F	88,07	91,29	89,68
vz. G	25,46	27,95	26,705
vz. H	21,81	23,47	22,64
vz. I	53,48	57,13	55,305
vz. J	67,81	70,49	69,15
vz. K	13,11	15,43	14,27
vz. L	22,89	24,47	23,68
vz. M	41,31	46,27	43,79
vz. N	89,13	87,48	88,305
vz. O	23,78	23,91	23,845

### 3.7 Navržení primerů

Primery pro použití k PCR musejí být velmi specifické. Z tohoto důvodu jsem si nejprve našla v internetové databázi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> mnou vyšetřovaný gen *TP53*, resp. část genu *TP53*, v mém případě exon 11. V internetové databázi NCBI jsem si zadala vyhledávaný gen s podmínkou, že hledám „nukleotid“ a zjišťuji ho u



„homo sapiens“. Nalezený gen jsem si zobrazila v grafické podobě, abych lépe viděla velikost vybraného exonu 11, se kterým budu nadále pracovat. (Exon je na grafu vyznačený černou barvou v pravém dolním rohu).



Obrázek 3: Grafická podoba genu TP53 (zdroj: vlastní)

Pro navržení specifických primerů je nutné pracovat s programem Primer – BLAST, který pomáhá uživatelům navrhnout specifické primery, které potřebují. Primer-BLAST nabízí flexibilitu pro přizpůsobení potřebám různých návrhů vlastních primerů. Uživatelé si mohou buď navrhnout nové primery nebo zjistit a zkontrolovat specifičnost již existujících primerů. S mým vedoucím jsme zvolili druhou možnost, tedy zjistili jsme z osvědčených zdrojů, jaké jsou specifické cílové primery pro exon 11 u genu p53 a zkontrolovali si specifičnost vyrobených primerů. Primery byly syntetizovány na zakázku firmou Generi Biotech a byly navrženy tak, aby se zajistilo osekvenování celého požadovaného exonu 11 genu p53.

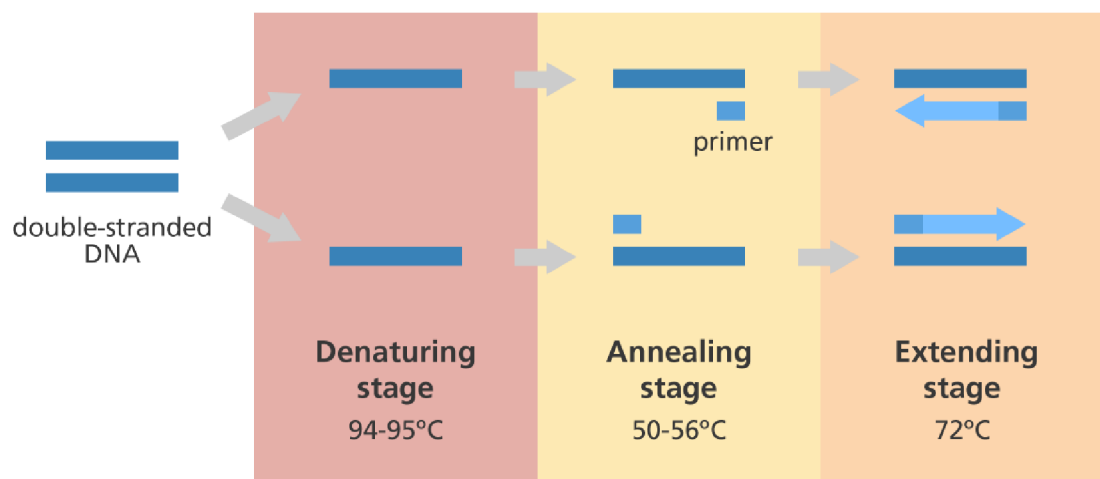
11	tcccgttgccagcctt	476	58
	taacccttaactgcaagaacat		

Obrázek 4: Podoba specifických primerů pro exon 11, celková délka produktu a specifická teplota pro nasedání primerů při PCR. (zdroj: PNAS, 2006)

### 3.8 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Polymerázová řetězová reakce je metoda, která se využívá v molekulární biologii za účel vytvoření mnoha kopií neboli amplifikací malých segmentů DNA nebo RNA. Pomocí PCR je možné vytvořit tisíce až miliony kopií určitého úseku DNA z velmi malého množství DNA. (Roche, 2021)

PCR je běžná metoda využívaná v lékařských a biologických výzkumných laboratořích. Používá se v raných fázích zpracování DNA pro sekvenování, detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti genu, který pomáhá identifikovat patogeny, během infekce, a při generování forenzních profilů DNA z malých vzorků DNA. (yourgenome, 2017)



Obrázek 5: Snímek zobrazující hlavní kroky metody PCR (zdroj: yourgenom, 2017)

#### 3.8.1 Princip

Principy každé polymerázové řetězové reakce, jsou stejné, bez ohledu na vzorek. K vytvoření této reakce je zapotřebí pět základních věcí. Těmi jsou:

- DNA templát – je v molekulární biologii označení pro jednořetězovou DNA, který je využíván jako zdroj informací při tvorbě kopií těchto nukleových kyselin. (Kodíček, 2007)
- Primery – krátké úseky DNA, které iniciují reakci PCR, navržené tak, aby se navázaly na obě strany části DNA.
- Nukleotidové báze – Adenin, Cytosin, Guanin a Tyrosin jsou stavebními kameny DNA a jsou potřebné k vytvoření nového řetězce DNA.

- Enzym Taq polymeráza – pro vytvoření nového vlákna DNA
- Pufr – pro zajištění správných podmínek pro reakci

PCR zahrnuje proces zahřívání a chlazení nazývaný tepelné cyklování, které je prováděno strojem zvaným Thermocycler, kdy se tento cyklus opakuje 35x. (Bártová, 2011; yourgenom, 2017)

### **3.8.2 Denaturace**

Zahřátím DNA na teplotu kolem 95 °C se rozpadnou vodíkové můstky mezi vlákny DNA, čímž se dsDNA rozdělí na ssDNA. (Šmarda, 2005)

### **3.8.3 Annealing**

Při annealingu neboli hybridizaci se reakční směs ochladí a probíhá při teplotě 50-60 °C, v našem případě případě při 58 °C. Jednořetězové molekuly po tomto ochlazení opět renaturují. Toto ochlazení umožní primerům navázat se na specifické místo ssDNA prostřednictvím vodíkových můstků. (yourgenom, 2017)

### **3.8.4 Elongace**

Syntéza nových řetězců probíhá při teplotě 65–75 °C. Oligonukleotidy, které dosedly na jednořetězovou DNA (templát) v předešlém kroku, slouží v tomto kroku jako primery pro DNA polymerasu. Od jejich 3'-konce začíná syntéza nového řetězce komplementárního s templátem. (Šmarda, 2005)

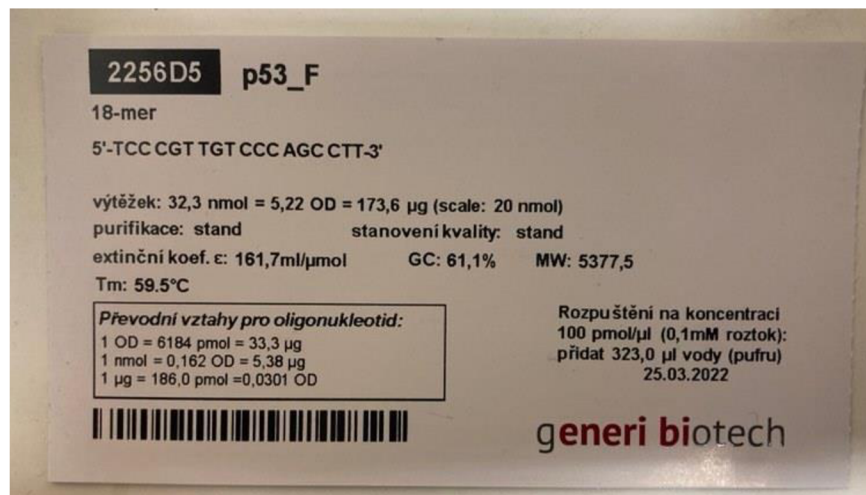
### **3.8.5 Reagencie**

- DNA
- MasterMix Combi PPP obsahující Taq DNA polymerázu a nukleotidy od firmy Top – Bio
- Primer reverse
- Primer forward
- PCR voda
- Pufr TBE

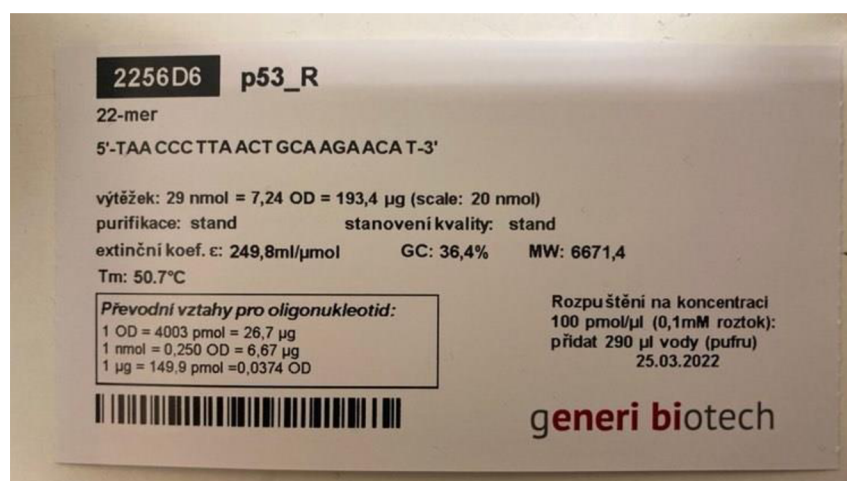
### 3.8.6 Pracovní postup

V laminárním boxu jsem si do stojánku připravila mikrozkušavky typu Eppendorf o objemu 0,2 ml, které jsem si nechala sterilizovat UV světlem. Mikrozkušavky Eppendorf jsem si popsalá lihovým fixem po straně i na víčko, jelikož v termocykleru se stává, že působením tepla se se mohou napsaná čísla smazat.

Před samotným postupem práce pro PCR jsem se seznámila se specifickými primery, ke kterým jsem obdržela informační kartičky. Oba primery jsem dostala v pevné fázi a pro jejich využití je bylo třeba smísit s objemem vody, který byl uveden na informační kartičce (viz Obrázek 6 a 7).



Obrázek 6: Informační kartička k primeru forward (zdroj: vlastní)



Obrázek 7: Informační kartička k primeru reverse (zdroj: vlastní)

PCR reakce byla prováděna v celkovém objemu 15  $\mu\text{l}$ . Do každé mikrozkušavky jsem napipetovala 7,5  $\mu\text{l}$  MasterMixu, zeleně zbarvený, dále 1,5  $\mu\text{l}$  Forward primeru, 1,5  $\mu\text{l}$  Reverse primeru a 2,5  $\mu\text{l}$  PCR vody. Do každé zkumavky, do které jsem přidala směs výše popsanou jsem také napipetovala 2  $\mu\text{l}$  DNA. Množství DNA jsem upravovala v závislosti na její koncentraci. Pokud se jednalo o koncentraci 20–60 pipetovala jsem 2  $\mu\text{l}$ , pokud koncentrace byla nižší, pipetovala jsem 3  $\mu\text{l}$ . Naopak když koncentrace byla vyšší volila jsem 1–1,5  $\mu\text{l}$ .

Samotná PCR reakce probíhala v termocykleru. Použila jsem tento teplotní profil:

- počáteční denaturace 95 °C 10 min
- denaturace 95 °C 30 s
- annealing 58 °C 30 s
- extenze 72 °C 1 min
- konečná extenze 72 °C 10 min; počet cyklů 35.

Kontrolu úspěšnosti amplifikace jsem provedena pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu.

### **3.9 Elektroforéza**

Tato metoda je využívána k oddělení malých částí DNA nebo i jiných makromolekul, jako je například RNA nebo bílkoviny. Princip oddělování fragmentů záleží na velikosti a náboji zkoumaných makromolekul. Tato metoda zahrnuje protékání proudu gelem. Na základě velikosti a náboje budou molekuly cestovat gelem různou rychlostí a různým směrem, což vede k oddělení částí od sebe. Molekuly DNA mají stejný náboj, z tohoto důvodu se DNA fragmenty oddělují pouze na základě velikosti. Pomocí elektroforézy můžeme zjistit kolik fragmentů DNA je přítomných ve vzorku a jak jsou vzájemně vůči sobě velké (Khan Academy, 2021).

#### **3.9.1 Reagencie**

- Agaróza (SERVA)
- TBE 1 pufr
- Ethidium Bromid (SERVA)

### 3.9.2 Pracovní postup

Pro výrobu elektroforézního gelu jsem použila TBE 1 pufr. Pro mou potřebu jsem použila 150 ml pufru. Navázila jsem si 3 g agarózy a kvantitativně jsem jej převedla do Erlenmeyerovy baňky společně se 150 ml TBE 1v% pufru. Tento roztok jsem vložila do mikrovlnné trouby a zahřívala jej, do té doby, než se agaróza zcela rozpustila a roztok byl čirý. Zahřátý gel jsem dále chladila pod tekoucí vodou na 70 °C a přidala do něj 8 ul ethidium bromid. Pro manipulaci s ethidium bromid jsem používala rukavice a pracovala zodpovědně, jelikož se považuje za mutagen, protože se interkaluje do DNA, což mění její strukturu. Ethidium bromid je zde využíván pro vizualizaci fragmentů DNA. Tekutý gel jsem vylila do formy na tuhnutí gelu a přidala hřebínek, aby se v gelu následně vytvořily jamky pro umístění vzorku. Vzorky po PCR jsem několikrát za sebou zvortexovala a stočila na minicentrifuze. Do první jamky elektroforézního gelu jsem napipetovala 5 ul DNA Leaderu a do dalších jamek 5 ul vzorků DNA. Gel jsem vložila do elektroforetické vany zavřela jsem ji víkem a napojila elektrody. Tento přístroj jsem nastavila na 80 V a 25 minut. Po tomto procesu jsem gel přesunula na UV lampu a zdokumentovala výsledek.



Obrázek 8: Průběh elektroforézy (zdroj: vlastní)

Elektroforézu jsem prováděla opakovaně i u stejných vzorků vzhledem k tomu, že po první elektroforéze nebyly znatelné proužky pod UV světlem. Na Obrázku 8 jsou proto uvedeny vzorky 1,5,7,13 a E, F, H, u kterých jsem musela opakovat PCR jako u několika dalších. Světlé proužky na elektroforézním gelu značí, že PCR se povedla a vzorek je připraven k dalšímu používání, v mém případě k přečištění a dále k sekvenování. Vzorky, které nevytvořily tzv. band jsem k sekvenci neposílala, jelikož to bylo zbytečné.

### **3.10 Čištění PCR produktů za použití Enzymatic PCR cleanup using Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase**

Díky této metodě jsem mohla přečistit mé PCR produkty od přebytečných primerů z předešlé PCR reakce. K vyčištění PCR produktu jsou důležité 2 enzymy.

- Exonukleáza (Exo I, 0,5  $\mu$ l)
- Shrim alkalická fosfatáza (rSAP, 1  $\mu$ l)

Produkty PCR jsem enzymaticky přečistila v termocycleru po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Dále jsem zvýšila teplotu na 80 °C, aby se enzymy inaktivovaly.

### **3.11 Příprava vzorků na sekvenaci**

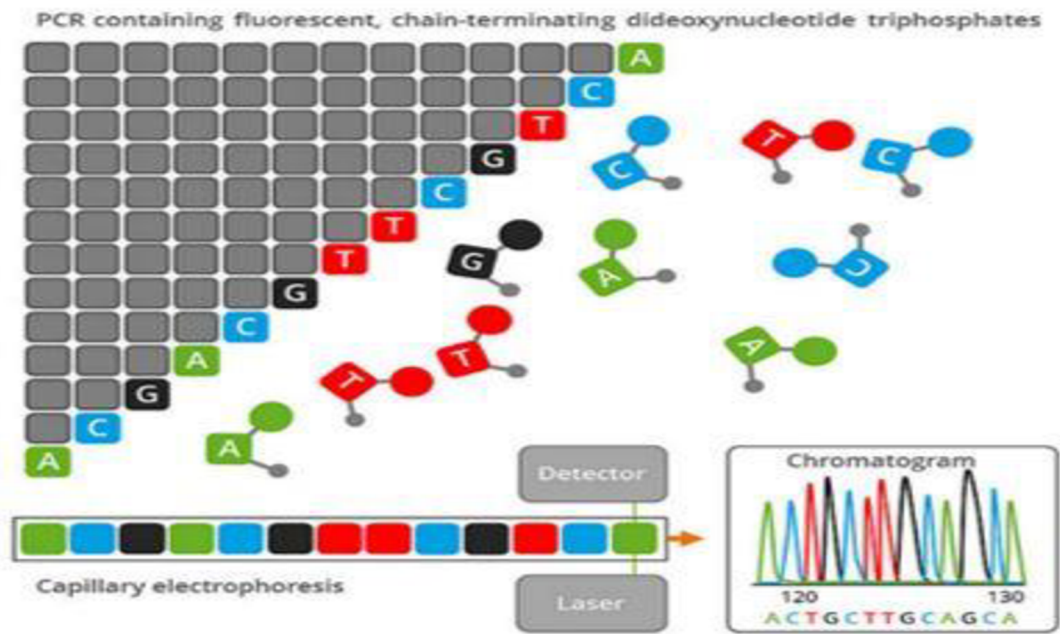
Všechny vzorky, u kterých mi správně vyšla PCR metoda, jsem si zkompletovala a dala si je do jiného stojánku, aby nedošlo k záměně se vzorky, u kterých PCR neproběhla. Připravila jsem si mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a přelepila je barcodem od firmy GenSeq. Druhou část jsem si vlepila do mého poznámkového bloku, abych později věděla, o jaký vzorek se jedná. Pro každý vzorek jsem měla připravené dvě zkumavky, pro primer forward a druhou pro primer reverse. Do každé zkumavky jsem napipetovala 5  $\mu$ l příslušného naředitelného primeru a do každé pak 1  $\mu$ l PCR produktu, v případě vyšších či nižších hodnot, jsem tento objem měnila. Do příslušného objemu 10  $\mu$ l jsem jej doplnila PCR vodou. Následně jsem zkumavky řádně uzavřela. Takto připravené mikrozkušavky jsem vložila do laminárního boxu výše zmiňované firmy Genseq na Akademii věd v areálu Jihočeské univerzity. Výsledky sekvenace byly zhruba do 3 pracovních dnů po přihlášení dostupné na webových stránkách této firmy.

### **3.12 Metoda Sangerovo sekvenování**

Sekvenování DNA je označení pro biochemické metody, kterými se zjišťuje pořadí nukleových bází (adenin, cytosin, guanin, thymin) v sekvencích DNA. Tyto sekvence jsou důležitou součástí dědičné informace v jádru buňky (Raclavský, 2003).

Vzorek DNA, který je připraven k sekvenaci se smíchá ve zkumavce s primerem, DNA polymerázou a DNA nukleotidy (dATP, dTTP, dGTP a dCTP). Poté se do zkumavky přidají čtyři fluorescenčně značené dideoxynukleotidy, které při navázání, ukončují syntézu řetězce. Tato směs se nejdříve zahřeje, aby došlo k denaturaci templátové DNA. Při procesu denaturace se od sebe oddělí vlákna DNA. Poté se směs

ochladí, kvůli tomu, aby došlo k navázání primeru na jednořetězový templát. Když dojde k navázání primeru, teplota se opětovně zvýší, což umožňuje DNA polymeráze syntetizovat novou DNA. Výsledkem Sangerova sekvenování je směs jinak dlouhých sekvencí DNA, které začínají primerem a končí určitým dideoxynukleotidem (Nature Education, 2014).



Obrázek 9: Metoda Sangerovo sekvenování (zdroj: Biogen, 2022)



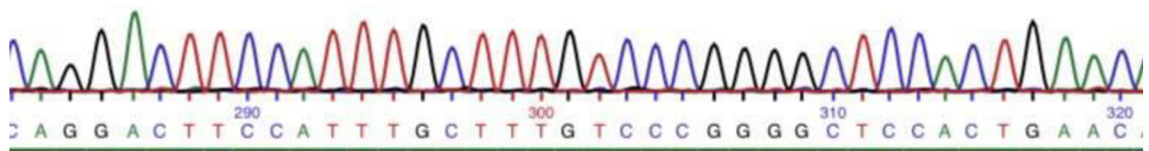
## 4 Výsledky

Vyšetřila jsem 30 vybraných jedinců, od kterých byl získán a osekvenován exon 11 genu *TP53*. V této práci bylo nutné odebrat vzorky, izolovat DNA a změřit její koncentraci, metoda PCR, elektroforéza, enzymatické přečištění PCR produktů a příprava konečného produktu k sekvenaci. Druhým cílem mé praktické části bylo porovnat 40 sekvencí genu *TP53* (20 sekvencí forward a 20 sekvencí), tedy u vzorků, kde proběhla PCR. Posledním cílem bylo, zhodnotit případné nalezené mutace v tomto genu.

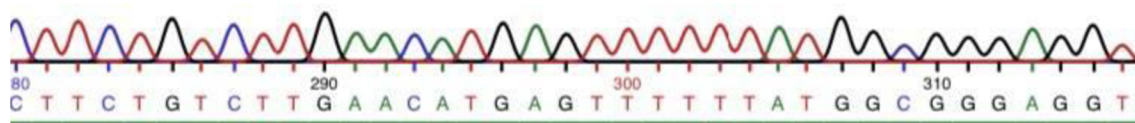
### 4.1 Hodnocení sekvencí

Osekvenované vzorky firmou GenSeq byly dostupné na stránkách této firmy, kde jsem si mé vzorky dokázala vyhledat pomocí barcodu. Sekvence jsem hodnotila ve formátu PDF. Nejdříve jsem sekvence hodnotila „okometricky“, to znamená, že jsem v sekvenci vyhledávala různé neshody, překryvy píků, které by mohly značit heterozygotní mutaci. Zpočátku jsem se u několika vzorků domnívala, že jde o heterozygotní mutace, avšak můj vedoucí mě upozornil, že o heterozygotní mutace se nejedná, jen je vzorek kontaminován jinou DNA, proto tyto vzorky nemohly být hodnoceny, a proto v tabulce uvádím „Nelze hodnotit“.

Po vyhodnocení heterozygotních mutací jsem přešla k hodnocení mutací homozygotních pomocí programu NCBI Blast, kam jsem zkopírovala osekvenovanou část exonu. Výsledek se zde ukáže jako procentuální shoda a obrázek osekvenovaného genu s nukleotidy a grafem.



Obrázek 10: Ukázka sekvence genu *TP53* forward mezi bázemi 280-320 ve formátu PDF (zdroj: vlastní)



Obrázek 11: Ukázka sekvence genu TP53 reverse mezi bázemi 280-320 ve formátu PDF (zdroj: vlastní)

Takto vypadající sekvence ve formátu PDF jsem tedy vložila do programu NCBI Blast a ukázala se mi fotografie a procentuální shoda, jak je vidět na níže uvedeném obrázku (viz. Obrázek 12). Jde zde vidět, že shoda s NCBI je 100 %, tím pádem tu nebyla nalezena žádná mutace.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
680 bits(368)	0.0	368/368(100%)	0/368(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGAC	60		
Sbjct 22861	CCACCTGAAGTCCAAAAAGGGTCAGTCTACCTCCCGCCATAAAAAACTCATGTTCAAGAC	22920		
Query 61	AGAAGGGCCTGACTCAGACTGACATTCTCCACTTCTTGTCCCCACTGACAGCCTCCCAC	120		
Sbjct 22921	AGAAGGGCCTGACTCAGACTGACATTCTCCACTTCTTGTCCCCACTGACAGCCTCCCAC	22980		
Query 121	CCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCCTTGCTTGAATA	180		
Sbjct 22981	CCCCATCTCTCCCTCCCCTGCCATTTGGGTTTTGGGTCTTTGAACCCTTGCTTGAATA	23040		
Query 181	GGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCAGGGCTCCACTGAACAA	240		
Sbjct 23041	GGTGTGCGTCAGAAGCACCCAGGACTTCCATTTGCTTTGTCCCAGGGCTCCACTGAACAA	23100		
Query 241	GTTGGCCTGCACTGGTGTGTTTGTGTTGGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCAGCTT	300		
Sbjct 23101	GTTGGCCTGCACTGGTGTGTTTGTGTTGGGGAGGAGGATGGGGAGTAGGACATACCAGCTT	23160		
Query 301	AGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATGTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCAGTT	360		
Sbjct 23161	AGATTTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATGTTGGGAGATGTAAGAAATGTTCTTGCAGTT	23220		
Query 361	AAGGGTTA	368		
Sbjct 23221	AAGGGTTA	23228		

Obrázek 12: Příklad 100% shody vzorku s databází NCBI (zdroj: vlastní)

Do následujících dvou tabulek jsem vložila výsledky vzorků třiceti vyšetřovaných jedinců z mého blízkého okolí.

Tabulka 6: Shoda vyšetřovaných sekvencí u skupiny s karcinomem v rodinné anamnéze s databází NCBI (zdroj: vlastní)

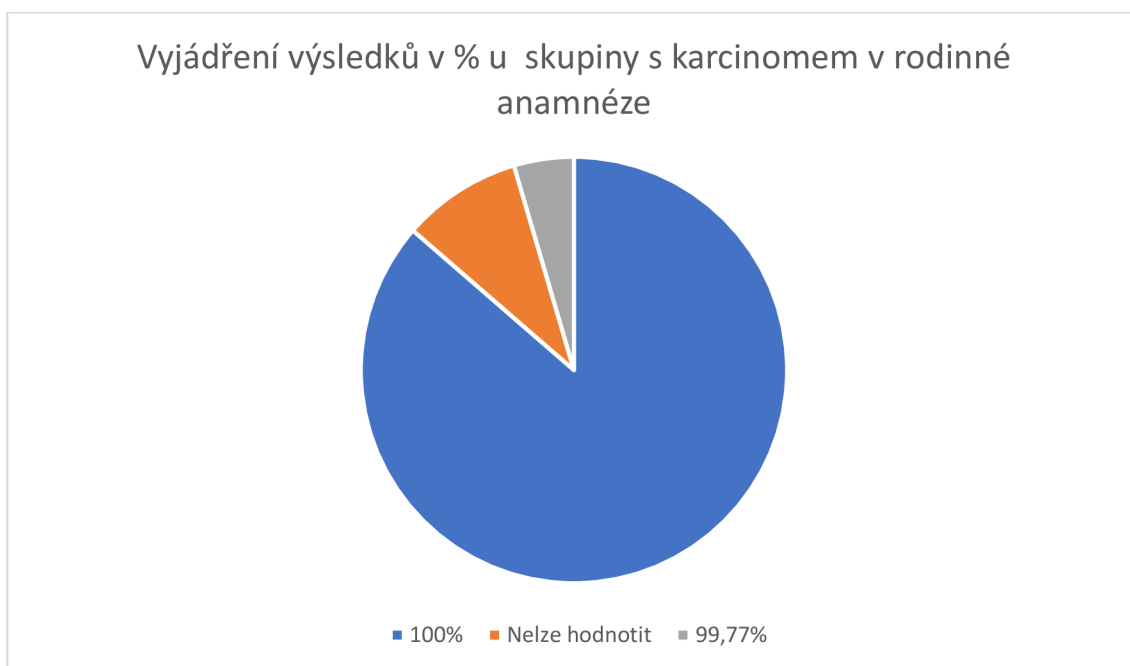
Vzorek	Vlákno F/R	Shoda s NCBI	Lokace
1	Forward	100 %	22803-22862
	Reverse	100 %	22752-23178
2	Forward	100 %	22809-23228
	Reverse	100 %	22752-23177
3	Forward	100 %	22810-23147
	Reverse	100 %	23120-23161
4	Forward	100 %	22810-23199
	Reverse	100 %	22973-23176
5	Forward	100 %	22808-22865
	Reverse	100 %	22752-23161
6	Forward	100 %	22810-23228
	Reverse	100 %	22783-23171
7	Forward	100 %	22809-23148
	Reverse	100 %	22968-23177
8	Forward	100 %	22809-22862
	Reverse	100 %	22803-23149
9	Forward	-	-
	Reverse	-	-
10	Forward	-	-
	Reverse	-	-
11	Forward	-	-
	Reverse	-	-
12	Forward	-	-
	Reverse	-	-
13	Forward	100 %	22810-23228
	Reverse	100 %	22752-23176
14	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Reverse	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
15	Forward	99,77 %	22804-23228
	Reverse	100 %	22806-23221

Tabulka 7: Shoda vyšetřovaných sekvencí u kontrolní skupiny s databází NCBI (zdroj: vlastní)

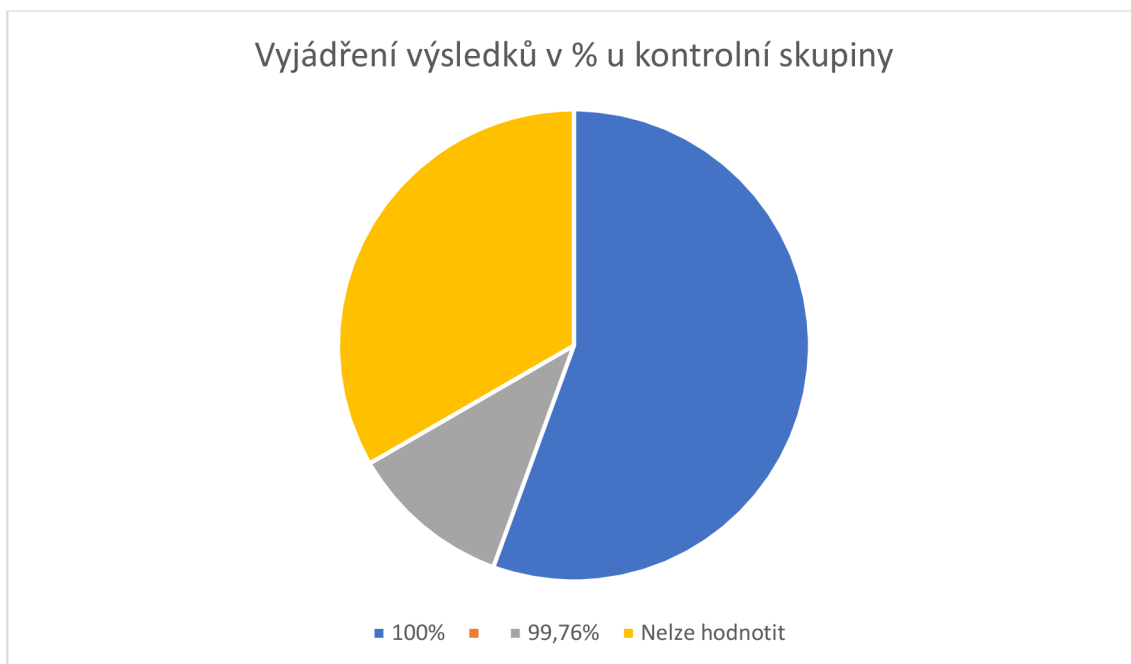
Vzorek	Vlákno F/R	Shoda s NCBI	Lokace
A	Forward	100 %	22807-23228
	Reverse	100 %	22972-23177
B	Forward	-	-
	Reverse	-	-
C	Forward	-	-
	Reverse	-	-
D	Forward	-	-
	Reverse	-	-
E	Forward	100 %	22812-23228
	Reverse	100 %	22752-23173
F	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Reverse	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
G	Forward	-	-
	Reverse	-	-
H	Forward	100 %	22861-23195
	Reverse	100 %	22953-23168
I	Forward	100 %	22861-23228
	Reverse	100 %	22752-23174
J	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Reverse	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
K	Forward	99,76 %	22825-23228
	Reverse	100 %	22968-23175
L	Forward	100 %	22816-23228
	Reverse	99,76 %	22782-23174

M	Forward	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
	Reverse	Nelze hodnotit	Nelze hodnotit
N	Forward	-	-
	Reverse	-	-
O	Forward	-	-
	Reverse	-	-

V následujících grafech jsou zobrazené výsledky 20 probandů v procentech.



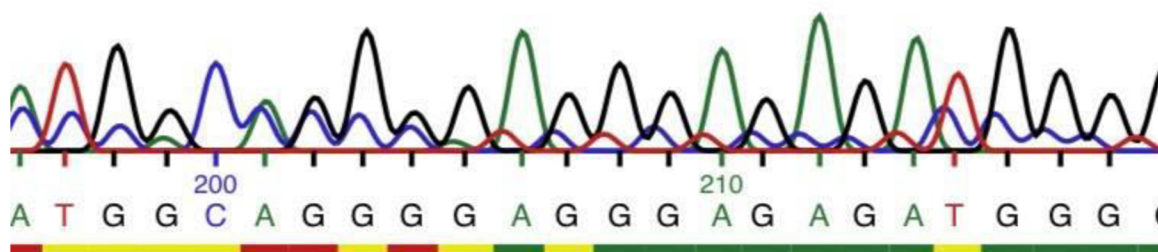
Obrázek 13: Graf shody s NCBI (zdroj: vlastní)



*Obrázek 14: Graf shody s NCBI (zdroj: vlastní)*

Z celého vyšetřovaného souboru nebyla nalezena žádná mutace. Vzorke s označením 15, K, L s nižší procentuální shodou se zdají na první pohled jako vzorky s mutací, nicméně se jedná o špatně čitelnou sekvenci, kterou databáze nesprávně čte.

V tabulkách (viz Tabulka 6 a Tabulka 7) jsou uvedeny vzorky s označením „Nelze hodnotit“, jedná se o vzorky, které byly kontaminovány, nejspíše jinou DNA. Vzorke, které mají v buňkách pro shodu s NCBI a lokaci pouze pomlku, jsou vzorky, které nepotvrdila elektroforéza, tím pádem nebyly odeslány k sekvenaci.



*Obrázek 15: Kontaminovaný vzorek jinou DNA ve formátu PDF (zdroj: vlastní)*

## 5 Diskuse

Má bakalářská práce byla zaměřena na analýzu mutací v genu *TP53* a jeho sekvenaci, respektive sekvenaci exonu 11 u příslušných vzorků. Sekvenování mi poskytla firma GenSeq. s.r.o. v Českých Budějovicích. Prvním cílem mé praktické části bylo vyšetřit 30 vzorků. Nicméně vzorky s označením 9, 10, 11, 12, B, C, D, G, N, O jsem musela vyřadit z důvodu takového, že mi u těchto vzorků neproběhla elektroforéza, která slouží právě jako kontrola, zda byla úspěšná amplifikace genů v PCR. Mohlo by se přihlédnout k tomu, že nejspíše nastala chyba během odběru z bukálu. Při odběru z bukálních stěrů, jak se můžeme dozvědět v laboratorní příručce pro GenLabs s.r.o. (Bystřická, 2020), totiž velice záleží na správném odběru. Stěr musí být proveden u respondenta, který nepil, nejedl, nekouřil a pouze si vypláchl ústní dutinu obyčejnou vodou. Od dvou respondentů, mi po izolaci DNA, bylo sděleno, že i přes to, že byli seznámeni se správným postupem odběru, kouřili a snídali. Tyto vzorky jsem tedy izolovala a pokoušela se o PCR, nicméně jsem je musela vyřadit, jelikož elektroforéza nepotvrdila správnou amplifikaci při této metodě. U dalších vzorků, které nebyly zařazeny do vyhodnocení, mohl nastat problém ve stáří stěru. Uvádí se, že bukální stěr vydrží 48 h, což by mohl být jeden z problému, jelikož některé vzorky jsem izolovala až po 48 h. Nicméně dle slov mého školitele Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. při správném skladování, může vzorek vydržet o něco déle. To mohu potvrdit, jelikož z pár vzorků byla DNA izolována po více jak 72 hodinách a tyto vzorky nebyly problémové. Co se týká zhodnocení mých výsledků, měla jsem vyhodnotit sekvenční data a případně okomentovat nalezené mutace. Z celého vyšetřovaného souboru nebyla nalezena žádná mutace. Vzorky s označením 15, K, L s nižší procentuální shodou se zdají na první pohled jako vzorky s mutací, nicméně se jedná o špatně čitelnou sekvenci, kterou databáze NCBI nesprávně čte. Frekvence patogenních mutací, jak u skupiny probandů s karcinomem v rodinné anamnéze, tak i u kontrolní skupiny, je tedy nulová.

Když se zaměřím přímo na gen *TP53*. Protein p53 je nádorový supresor, který se účastní regulace buněčného cyklu a prevence nádorového bujení. U více než 50 % lidských maligních nádorů dochází k mutaci genu *TP53* (Olivier et al.2010).

Mutace *TP53* jsou potenciálním prognostickým a prediktivním markerem a také cíl pro farmakologickou intervenci. Všechny mutace nalezené u lidských karcinomu jsou shromážděny v databázi IARD *TP53* dostupné z <http://www-p53.iarc.fr/>.

V mém hodnocení výsledků uvádím, že se mi nepodařilo najít jak heterozygotní mutaci, tak ani homozygotní mutaci. Tento gen jsem vyšetřovala u respondentů, kteří

v blízké rodině mají někoho, kdo trpěl určitým karcinomem, či dokonce na něj zemřel. Uvádí se že 50 % mutací se nachází u pacientů, kteří nádorem již trpí. Je tedy jisté, pokud by se v mých respondentech objevil někdo, kdo má jistou prognózu, mutaci bych jistě zachytila.

Co se týká různých druhů mutací, nejčastější jsou mutace somatické (Hollstein et al., 1991).

Somatické mutace *TP53* se vyskytují téměř u každého typu rakoviny v míře od 38 % do 50 % u rakoviny vaječníků, jícnu, kolorektálního karcinomu, hlavy a krku, hrtanu a plic až po asi 5 % u primární leukémie, sarkomu, rakoviny varlat, maligního melanomu, a rakoviny děložního čípku (Wang et al., 2004).

Na základě studií, které zkoumaly celou kódující sekvenci, se 86 % mutací shlukuje mezi kodony 125 a 300, což odpovídá především doméně vázající DNA. Většina mutací v této oblasti je missense (87,9 %). Naproti tomu mimo tuto oblast představují missense mutace pouze asi 40 %, přičemž většina mutací je nesmyslná nebo posun čtecího rámce (Jones et al. 1992).

To dokazuje, že jsem měla malou pravděpodobnost najít mutace, vzhledem k tomu, že jsem se zabývala exonem 11, který se nachází už v oblasti C – koncová oblast.

Zárodečné mutace *TP53* jsou základní příčinou Li-Fraumeniho syndromu, familiárního seskupení časných nádorů včetně sarkomů, rakoviny prsu, mozkových nádorů a karcinomů kůry nadledvin. Za posledních 20 let byly mutace zárodečné linie *TP53* detekovány u asi 500 rodin nebo jedinců s úplnými nebo částečnými rysy Li-Fraumeniho syndromu (Olivier et al., 2003).

Tento syndrom byl obecně považován za vzácný syndrom. Nicméně screening zárodečné mutace *TP53* u pacientek s časným nástupem rakoviny prsu a neselektovaných pro familiární anamnézu ukázal mutace *TP53* ve 2 %–3 % případů (Lalloo et al., 2006), zatímco screening 525 pacientek s jakýmkoliv druhem rakoviny rodinná anamnéza identifikovala 91 (17,3 %) mutací *TP53* (Gonzalez et al., 2009).

Na základě těchto výsledků může mutace *TP53* přispívat až k 17 % všech familiárních případů rakoviny. Studie v jižní Brazílii identifikovaly mnoho rodin se zakladatelskou mutací (R337H). Mutace zárodečné linie *TP53* tedy mohou být častější, než bylo dříve rozpoznáno, a vyskytují se přibližně u 1 z 5 000 až 1 z 20 000 porodů (Lalloo et al., 2006; Gonzalez et al., 2009).



## 6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo z klinického a genetického hlediska definovat problematiku a shrnout informace o genu *TP53*, který má důležitou roli při ochraně organismu před vznikem karcinomu. Čím více bude svět vědět o karcinomu a o jeho genetickém podkladu, tím se budeme moci zabírat jeho léčbou a bude se předcházet úmrtí. Je velmi důležité, aby se více začaly preventivně vyšetřovat mutace u lidí, kteří k rakovině mají predispozice, tím by došlo k rychlejšímu odhalení rizika, mohl by se předpokládat průběh nemoci a symptomy.

U výzkumné části práce jsem se zajímala o exon 11 a odhalení mutací jak heterozygotních, tak homozygotních. Avšak mutace v souboru o 20 probandech jsem nenalezla.

Díky této bakalářské práci jsem si dokázala osvojit samostatnou práci v laboratoři, základní molekulárně genetické metody, naučila se vyhodnotit a číst sekvence a pracovat s genetickými databázemi.

## 7 Seznam literatury

1. ALBERTS, Bruce. Molecular biology of the cell [online]. New York: Garland Space, 2002 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: [https://archive.org/details/molecularbiology0004albeAMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Li-Fraumeni Syndrome \[online\]. 2020 \[cit. 2022-04-27\]. Dostupné z: https://www.cancer.net/cancer-types/li-fraumeni-syndrome](https://archive.org/details/molecularbiology0004albeAMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Li-Fraumeni Syndrome [online]. 2020 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: https://www.cancer.net/cancer-types/li-fraumeni-syndrome)
2. BÁRTOVÁ, Eva. Molekulární biologie: PCR (polymerázová řetězová reakce) [online]. 2011 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)
3. BENEŠ, Jiří. Studijní materiály: Otázky z onkologie [online]. 2006 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: [http://jirben2.chytrak.cz/materialy/onko\\_JB.doc](http://jirben2.chytrak.cz/materialy/onko_JB.doc)
4. BEZDĚKOVÁ, Milada, et al. Patologie pro speciální pedagogy: Definice a vlastnosti nádorů [online]. 2011 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: [http://pasp.upol.cz/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54:definice-a-vlastnosti-nador&catid=12:nadory&Itemid=4](http://pasp.upol.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=54:definice-a-vlastnosti-nador&catid=12:nadory&Itemid=4)
5. BIOGEN PRAHA S.R.O. Klasická sekvenace [online]. 2022 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://biogen.cz/klasicka-sekvenace>
6. BOURDON, Jean-Christophe et al. P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity.: Genes & development [online]. 2005 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221884/pdf/00192122.pdf>
7. Co je PCR? [online], 2022. ROCHE s.r.o., Diagnostics Division [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://diagnostics.roche.com/cz/cs/article-listing/what-is-pcr.html>
8. COOPER, Geoffrey M, 2000. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.: Tumor Suppressor Genes. NCBI [online]. Sunderland (MA): Sinauer Associates [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9894/table/A2667/?report=objectonly>
9. DNA sequencing [online]. Nature Education, 2014 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/definition/dna-sequencing-205/>
10. FORETOVÁ, Lenka. Dědičnost jako rizikový faktor pro vznik nádorů [online] 2021, Liga proti rakovině Praha z.s.
11. GONZALES, Kelly D. Beyond Li Fraumeni Syndrome: Clinical Characteristics of Families With p53 Germline Mutations. Journal of Clinical Oncology 27, no.

- 8 [online]. March 2009 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2008.16.6959>
12. HOLČÁKOVÁ, Jitka. Úloha inhibitorů cyklin dependentních kináz při indukci transkripčního stresu a jejich vliv na aktivaci nádorového supresoru p53 a jeho homologů [online]. Brno, 2008 [cit. 2021-11-22]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/p3604/>. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Bořivoj VOJTĚŠEK.
13. HOLLSTEIN, M et al. P53 mutations in human cancers. *Science* (New York, N.Y.) vol. 253 [online]. 1991 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1905840/>
14. HONG, Bo. Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities [online]. 2014 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24387333/>  
<https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/187/4515.pdf>
15. HUPP, Ted. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem Journal* [online]. 2000, 1-17 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221427/pdf/11062053.pdf>
16. CHÉNE, Peter.: The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene* 20 [online]. 10 May 2001 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/1204373>
17. Chytře na život, 2009–2021. ISSN 1802-8012. Dostupné také z: <https://www.vitalia.cz/katalog/nemoci/zhoubne-maligni-nadory/>
18. JONES, Peter A. Methylation, mutation and cancer. *BioEssays* [online]. January 1992, 33-36 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/bies.950140107>
19. KHAN ACADEMY, 2021. Gel electrophoresis [online]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
20. Kit for isolation of DNA from body fluids manual, 2015. GENERI BIOTECH s.r.o., 12 s. 1.4. Dostupné také z: [www.generi-biotech.com](http://www.generi-biotech.com)
21. KODÍČEK, Milan. Biochemické pojmy: výkladový slovník: Templát [online]. VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=templát](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=templát)

22. LALLO, Fiona. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives [online]. 2006 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: [https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049\(06\)00213-9/fulltext](https://www.ejcancer.com/article/S0959-8049(06)00213-9/fulltext)
23. LEVINE, Arnold. The many faces of p53: something for everyone: Journal of Molecular Cell Biology, Volume 11, Issue 7, July 2019, Pages 524–530 [online]. 15 August 2019 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz026>
24. MEDICINE CONSULTANT. Studie ukazuje proveditelnost protokolu screeningu u pacientů s Li-Fraumeni syndromem [online]. 2019 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <https://cze.medicine-consultant.com/study-shows-feasibility-cancer-screening-protocol95871>
25. OLIVIER, Magali et al. Li-Fraumeni and Related Syndromes: Correlation between Tumor Type, Family Structure, and TP53 Genotype. Cancer Research [online]. 15 October 2003 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/63/20/6643/510598/Li-Fraumeni-and-Related-SyndromesCorrelation>
26. PENOXAL: Obecně o rakovině, jak vzniká a rizikové faktory vzniku nádorů [online], 2021. [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <https://cz.penoxal.com/jak-rakovina-vznika-rizikove-faktory-nadoru/>
27. PETITJEAN, Audrey et al. Impact of Mutant p53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database [online]. WILEY-LISS, 2007 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/humu.20495>
28. PETRUŽELKA, Luboš. Onkologická péče u nemocných vyšší věkové skupiny [online]. Onkologická klinika 1. LF UK a VFN; OK 1.LF UK, VFN a ÚVN; ÚRO 1. LF UK a NNB, 27. září 2007 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/vekova-specifika/onkologicka-pece-u-nemocnych-vyssi-vekove-skupiny/>
29. PIETRANGELO, Ann. Healthline Media a Red Ventures Company: Benign and Malignant Tumors: How Do They Differ? Healthline Media a Red Ventures Company [online]. 23 October 2019 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/cancer/difference-between-benign-and-malignant-tumors#malignant-tumors>
30. RACLAVSKÝ, V., 2003. Metody molekulární genetiky [online]. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, 2003 [cit. 2009-06-20]. Kapitola 8. Sekvenování DNA. Dostupné z:

<https://web.archive.org/web/20100228153117/http://biologie.upol.cz/metody/Se-kvenovani%20DNA.htm>

31. STRACHAN, T. a AP. AP. Human Molecular Genetics 2: Cancer Genetics [online]. 1999 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <http://www.bioinformatics.org/p53/introduction.html>
32. STRANO, S et al. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* vol. 26 [online]. 2007 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi: 10.1038/sj.onc.1210296
33. STUART, Annie. Benign Tumors [online]. 25 July 2021 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/a-to-z-guides/benign-tumors-causes-treatments>
34. ŠIMEČKOVÁ, Šárka, 2011. Buněčná senescence a nádorová onemocnění. Brno. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta Ústav experimentální biologie Oddělení genetiky a molekulární biologie. Vedoucí práce Mgr. Karel Souček, Ph.D.
35. ŠÍPEK, Antonín. Onkogenetika: Nádorové [online]. 2010-2014 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/onkogenetika>
36. ŠMARDA, Jan. Polymerázová řetězová reakce. *Metody molekulární biologie* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2005 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1\\_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1\\_reakce](https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce)
37. ŠMARDOVÁ, Jana a Jan ŠMARDA, 2005. Functional analysis of p53 tumor suppressor in yeast. : Differentiation; research in biological diversity. PMID 16138827. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-0436.2005.00028.x
38. ŠMARDOVÁ, Jana a Jana KOPTÍKOVÁ. Brazílský příběh mutace p53 R337H. In: *Klinická onkologie* [online]. 2014, s. 247–248, Dostupné z: <https://www.muni.cz/vyzkum/publikace/1210664>
39. ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK: Missense mutace* [online]. 2011 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/missense-mutace>
40. TOWNSEND, Courtney M., 2010. Cancer Genetics. *The Enzymes* [online]. 2020 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/cancer-genetics>

41. WANG, Yun. Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Human mutation* vol. 24,1 [online]. 2004 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15221786/>
42. WEINBERG, Robert. *Journal of Molecular Cell Biology*, Volume 11, Issue 7, July 2019, Pages 531–533: How TP53 (almost) became an oncogene [online]. 13 August 2019 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jmcb/article/11/7/531/5529696>
43. What is PCR (polymerase chain reaction)? Yourgenom [online]. 2017 [cit. 2022-04-27].
44. WHO: Cancer - Symptoms and causes [online], 3 February 2022n. 1. [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
45. WINCHESTER, A.M. Genetics. *Encyclopedia Britannica* [online]. 15 May 2020 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/genetics>

## 8 Seznam příloh a obrázků

Obrázek 1: Dědičnost retinoblastomu. Postižení a normální jednotlivci jsou označeni fialovými a zelenými symboly. (zdroj: Cooper,2000).....	16
Obrázek 2: Delece Rb v retinoblastomu. Mnoho retinoblastomů má delece chromozomálního lokusu (13q14), který obsahuje gen Rb (zdroj: Cooper,2000) .....	16
Obrázek 3: Grafická podoba genu TP53 (zdroj: vlastní).....	29
Obrázek 4: Podoba specifických primerů pro exon 11, celková délka produktu a specifická teplota pro nasedání primerů při PCR. (zdroj: PNAS, 2006) .....	29
Obrázek 5: Snímek zobrazující hlavní kroky metody PCR (zdroj: yourgenom, 2017)..	30
Obrázek 6: Informační kartička k primeru forward (zdroj: vlastní).....	32
Obrázek 7: Informační kartička k primeru reverse (zdroj: vlastní) .....	32
Obrázek 8: Průběh elektroforézy (zdroj: vlastní) .....	34
Obrázek 9: Metoda Sangerovo sekvenování (zdroj: Biogen, 2022).....	36
Obrázek 10: Ukázka sekvence genu TP53 forward mezi bázemi 280-320 ve formátu PDF (zdroj: vlastní) .....	37
Obrázek 11: Ukázka sekvence genu TP53 reverse mezi bázemi 280-320 ve formátu PDF .....	38
Obrázek 12: Příklad 100% shody vzorku s databází NCBI (zdroj: vlastní) .....	38
Obrázek 13: Graf shody s NCBI (zdroj: vlastní) .....	41
Obrázek 14: Graf shody s NCBI (zdroj: vlastní) .....	42
Obrázek 15: Kontaminovaný vzorek jinou DNA ve formátu PDF (zdroj: vlastní).....	42
Tabulka 1: Klíčové rozdíly mezi benigní a maligní nádory (zdroj: Pietrangelo,2019)..	13
Tabulka 2: Seznam nejznámějších tumor supresorových genů, (zdroj: Cooper, 2000) .	14
Tabulka 3: Přehledný seznam anamnéz probandů (zdroj: vlastní).....	23
Tabulka 4: Přehledný seznam naměřených koncentrací izolovaných DNA (zdroj: vlastní) .....	27
Tabulka 5: Přehledný seznam naměřených koncentrací izolovaných DNA (zdroj: vlastní) .....	28
Tabulka 6: Shoda vyšetřovaných sekvencí u skupiny s karcinomem v rodinné anamnéze s databází NCBI (zdroj: vlastní) .....	38

Tabulka 7: Shoda vyšetřovaných sekvencí u kontrolní skupiny s databází NCBI (zdroj: vlastní) .....	40
--	----