



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MUTANTNÍ PROTEIN P53 A JEHO VAZEBNÉ A TRANSAKTIVAČNÍ VLASTNOSTI

MUTANT P53 PROTEIN AND ITS BINDING AND TRANSAKTIVATION PROPERTIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Matúš Vojsovič

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1667/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Matúš Vojsovič**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Mutantní protein p53 a jeho vazebné a transaktivační vlastnosti

Zadání diplomové práce:

LKultivace bakteriálních kultur
Izolace plasmidů
Transformace plasmidů do kvasinkových kultur
Luciferázová assay
Izolace proteinů a testování in vitro (EMSA, fluor. anizotropie)

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Matúš Vojsovič
student

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

„Strážca genómu“ proteín p53 zastupuje dôležitú úlohu pri rakovinovom bujení. Vo viac ako 50 % prípadoch ľudskej rakoviny dochádza k mutácii p53. Mutované proteíny výrazne ovplyvňujú správnu činnosť buniek. Vplyvom mutácii môžu proteíny získať, ale aj stratiť, niektoré zo svojich funkcií, ktoré im pomáhajú aj pri modulácii metabolizmu buniek. Mutantné formy p53 sa môžu podieľať na vytvorení nepriamej interakcie a aj priamej väzby k DNA.

Experimentálna časť práce sa zameriava na sledovanie väzbových vlastností vybraných mutantných proteínov p53 pomocou gélovej retardačnej analýzy a za použitia mikroskopu atomárnych síl a v sledovaní transaktivačného potenciálu. Výsledky boli porovnávané s pôvodnou nemutovanou formou p53. Bolo zistené, že pri väzbe k najbežnejším typom lokálnych štruktúr DNA dochádza k zníženiu väzbovej aktivity mutantných proteínov oproti nemutovanej forme. Sledovaním transaktivačných schopností bolo preukazané, že mutantné proteíny p53 sa vyznačujú nižšou intenzitou transaktivácie než pôvodný p53 a taktiež znižujú intenzitu transaktivácie, ak sú v koexpresii s p53.

ABSTRACT

The "genome guardian" protein p53 plays an important role in cancer growth. P53 mutations occur in more than 50 % of human cancers. Mutated proteins significantly affect the proper functioning of cells. Due to the mutation, proteins can gain, but also lose, some of their functions, which also help them in modulating cell metabolism. Mutant forms of p53 may be involved in indirect binding or direct binding to DNA. They appeared to have a lower binding activity to the DNA than non-mutated p53.

The experimental part of the thesis focuses on measuring the binding properties of selected p53 mutants using gel retardation analysis and using an atomic force microscope and monitoring the transactivation potential. The results were compared with the wild-type form of p53. It has been found that binding to the most common types of local DNA structures reduces the binding activity of p53 mutants over the wild-type. P53 mutants has been shown to have a lower intensity of transactivation than the wild-type p53 by studying their transactivation abilities and also they are able to reduce the intensity of transactivation when co-expressed with p53.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

p53, mutp53, väzbové vlastnosti, transaktivačné vlastnosti, PAGE-SDS, EMSA, AFM

KEYWORDS

P53, mutp53, binding properties, transactivation properties, PAGE-SDS, EMSA, AFM

VOJSOVIČ, Matúš. Mutantní protein p53 a jeho vazebné a transaktivační vlastnosti. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139026>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Václav Brázda.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne. Všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Chemickej fakulty VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

Podpis študenta

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som rád poďakoval vedúcemu mojej diplomovej práce pánu doc. Mgr. Václavovi Brázdovi, Ph.D. a Ing. Otílii Porubiakovej za odborné vedenie, cenné rady a čas, ktorý mi venovali pri vypracovávaní tejto práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická časť	8
2.1	Proteín p53	8
2.1.1	Chemická štruktúra p53	8
2.1.2	Funkcia p53.....	9
2.2	Mutantný proteín p53.....	10
2.2.1	Typy p53 mutácií	10
2.2.2	Zisk nových proteínových funkcií – GOF	11
2.2.3	Proonkogénna úloha.....	12
2.2.4	Modulácia metabolizmu.....	12
2.2.5	Stabilizácia mutp53 v nádorových bunkách	13
2.2.6	Typy mutácií <i>TP53</i> v ľudských nádoroch.....	13
2.2.7	Terapeutický prístup k mutp53	15
2.3	Transaktivácia mutp53	16
2.4	Väzba mutp53	16
2.4.1	Nepriame spojenie mutp53 s DNA	17
2.4.2	Priama väzba mutp53 s DNA.....	17
2.4.3	Lokálne štruktúry DNA	18
2.5	Metódy sledovania väzby proteínov k DNA.....	20
2.5.1	Gélová retardačná analýza	20
2.5.2	Mikroskopia atomárnych síl.....	21
3	Praktická časť	22
3.1	Materiál	22
3.1.1	Použité plazmidy	22
3.1.2	Použité bunky.....	22
3.1.3	Chemikálie	23
3.1.4	Ostatné materiály	24
3.1.5	Laboratórne prístroje.....	24
3.1.6	Príprava médií a roztokov	25
3.2	Izolácia plazmidovej DNA.....	26
3.3	Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	27

3.4	Príprava a izolácia proteínov.....	27
3.4.1	Bakteriálna transformácia	27
3.4.2	Izolácia proteínov.....	28
3.4.3	Stanovenie koncentrácie proteínov	28
3.4.4	Detekcia proteínov	29
3.5	EMSA.....	29
3.6	AFM.....	30
3.7	Transformácia kvasiniek	30
3.8	Analýza transaktivačného potenciálu.....	31
4	Výsledky a diskusia.....	32
4.1	Stanovenie koncentrácie a čistoty plazmidovej DNA.....	32
4.2	Príprava a izolácia proteínov.....	32
4.2.1	Bakteriálna transformácia	32
4.2.2	Stanovenie koncentrácie proteínov	33
4.2.3	Detekcia proteínov	33
4.3	EMSA.....	36
4.4	AFM.....	38
4.5	Analýza transaktivačného potenciálu.....	43
5	Záver	46
6	Zoznam použitej literatúry	47
7	Skratky a symboly.....	56

1 ÚVOD

Prvé informácie o proteíne p53 boli publikované v roku 1979 [1]. Pri výskume opičieho vírusu SV40 bol objavený T(mt) antigén – 35 kDa veľký proteín. V nasledujúcich rokoch bolo však preukázané, že SV40 nevytvára T(mt) antigén. Novoobjavený proteín o veľkosti 35 kDa sa hromadil v jadrách nádorových bunkách, a preto mu bola pripísaná onkogénna úloha [1, 2]. Onkogénna úloha bola následne vyvrátená a proteín p53 bol preradený do skupiny proteínov, ktoré potláčajú nádory – tumor supresorové proteíny [3].

V zdravých bunkách je koncentrácia p53 nízka. S rôznymi poškodeniami a stresovými faktormi sa zvyšuje koncentrácia p53 v jadrách buniek. Medzi hlavné úlohy proteínu p53 zaradujeme: zastavenie bunkového cyklu, opravu DNA a riadenú bunkovú smrť. Je schopný zastaviť bunkový cyklus pred prechodom do syntetickej fázy bunkového cyklu, s cieľom poskytnúť čas opravným mechanizmom obnoviť stabilitu genómu a zabrániť replikácii poškodenej genetickej informácie. P53 sa môže aktívne podieľať na oprave DNA reguláciou prostredníctvom transaktívacie iných génov alebo vlastnou biochemickou aktivitou [4]. Poslednou možnosťou, ako uchrániť zdravé bunky a zamedziť nekontrolovateľnej proliferácii buniek s pozmenenou DNA je apoptóza. P53 spúšťa kaskádu regulačných molekúl, ktoré spolupracujú na aktivácii enzýmu kaspáza 9 s cieľom usmrtiť poškodené bunky [5].

Proteín p53 je kódovaný génom *TP53*, ktorý sa vyznačuje najvyššou mierou mutácií u ľudí. Viac ako 68 % prípadov mutácie *TP53* sú jednobodové substitučné mutácie, ktoré sa najčastejšie vyskytujú v šiestich oblastiach p53. Medzi miesta s najvyššou frekvenciou mutácií patrí aminokyselina v pozícii 175 s frekvenciou mutácií okolo 10 % a v pozícii 273 s frekvenciou 12 % [6]. V nemutovanej forme sa na obidvoch miestach prekladá arginín. Vplyvom substitúcie dochádza k vytvoreniu kódonu pre histidín [7, 8].

Rôzne časti mutantných proteínov p53 (mutp53) sú schopné interagovať s DNA. Prvým typom interakcie je priama väzba k DNA, na ktorej sa podieľa centrálna doména proteínu. Dochádza k vytvoreniu sekvenčne špecifickej väzby p53 k DNA sekvencii p53CON. Na vytvorenie nepriameho spojenia k DNA sa podieľa C-koncová doména p53, ktorá vyhľadáva charakteristické motívy v lokálnych štruktúrach DNA.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Proteín p53

Proteín p53 je jedným z najštudovanejších tumor supresorových proteínov vďaka jeho kľúčovým úlohám pri udržovaní genetickej stability a inhibícii tvorby nádorových ochorení. Pri jeho aktivácii, po poškodení bunky, proteín p53 indukuje expresiu génov, podieľajúcich sa na oprave poškodenia DNA, bunkovom raste, zastavení bunkového cyklu alebo programovanej bunkovej smrti [3].

2.1.1 Chemická štruktúra p53

Proteín p53 bol pomenovaný podľa jeho molekulovej hmotnosti, pretože v PAGE-SDS géli (polyakrylamidový gél s prídavkom dodecylsulfátu sodného) bol detegovaný signál s veľkosťou 53 kDa [2]. Potvrdená veľkosť proteínu bola však neskôr vyvrátená novými zisteniami, ktoré popisovali obsah oblasti PRD (z angl.: „a proline-rich domain“) s vysokým počtom aminokyseliny prolín, ktorá spomaľuje migráciu v SDS géle. Pôvodná molekulová hmotnosť proteínu bola opravená na 43,7 kDa [9, 10].

Proteín p53 (obrázok 1) je zložený z 393 aminokyselín funkčne rozdelených do troch domén: N-koncová doména, DNA väzbová doména a C-koncová doména [11].



Obrázok 1: Štruktúra p53; TADI, TADII – transaktivačná doména 1,2, PrD – oblasť bohatá na prolín, DBD – DNA väzbová doména, OD – oligomerizačná doména [11].

N-koncová doména je zložená z dvoch transkripčne aktívnych subdomén: transaktivačná doména (TADI a TADII) a z oblasti bohatej na prolín (PRD) [9]. TADI obsahuje amfipatickú špirálu, ktorá slúži k aktivácii transkripčných faktorov (pri reakcii s GAL4, ktorého produkt je pozitívny regulátor expresie galaktózou vyvolaných génov, rekombinantný proteín začína transkripciu GAL4 operónu) a k regulácii niektorých proapoptotických génov [12, 13]. Oblasť TADII ovplyvňuje apoptotickú aktivitu. Vďaka bohatej sekvencii kyslých aminokyselín v TAD je celá doména nabitá záporným nábojom, čo napomáha vytvárať sekundárnu štruktúru α -helix. Subdoména PRD je významná pri apoptotických aktivitách, ale aj pri indukcii reaktívnych foriem O_2 [14].

DNA väzbová doména (DBD, z angl.: “DNA-binding domain“) je najdôležitejšou štruktúrnou oblasťou proteínu p53 a to vďaka jej úlohe pri špecifickej väzbe s DNA. Aminokyseliny 80 – 280 DBD oblasti vytvárajú špecifickú väzbu k DNA vo forme tetraméru – zoskupenie štyroch proteínov p53, medzi ktorými dochádza k spojeniu pomocou vodíkových mostíkov. Výnimočne môžu tieto aminokyseliny vytvárať aj nešpecifickú väzbu [15]. Aminokyseliny 280 – 290 viažu DNA nešpecificky, ale môžu sa podieľať aj na vzniku tetraméru. DBD doména viaže atómy zinku a obsahuje niekoľko molekúl aminokyseliny arginín, ktoré sú využívané k väzbe s určitými p53 korepresorami (ako napr. LM03). Mutácie v proteíne p53 sa zvyčajne vyskytujú práve v centrálnej doméne a najčastejšie sú to bodové mutácie v poradí AMK 175, 248, 249, 273 a 282 [16].

C-koncová doména je treťou oblasťou p53. C-koniec je tvorený tetramerizačnou (homo-oligomerizačnou) doménou (OD) a regulačnou doménou (RD). Doména OD pozostáva z dvoch

symetrických dimérov, z ktorých každý dimér je zložený z dvoch antiparalelných α -helixov a jedného antiparalelného β -skladaného listu. Diméry zodpovedajú za väzbovú aktivitu p53 [17]. AMK 316 – 325, nachádzajúce sa v DBD oblasti, slúžia ako jadrová lokalizačná signálna časť a regulačná oblasť je schopná svojou aktivitou ovplyvňovať doménu DBD [10].

Forma wtp53 obsahuje okrem α -helixu a β -skladaného listu taktiež neštruktúrované regióny na N- a C-koncoch. Analýzou CD spektier bol proteín p53 zaradený do skupiny proteínov s narušenou vnútornou štruktúrou (IDP – „intrinsically disordered protein“) [18].

Ďalším výskumom boli objavené proteíny p63 a p73, ktoré sú označované ako homológy proteínu p53, pretože ich DNA väzbová doména je podobná až na 63 % [19, 20]. Týmto zistením boli proteíny zaradené do skupiny, resp. rodiny p53. Časť funkcií proteínov z rodiny p53 je na sebe závislá a podmienená prítomnosťou iného proteínu z tejto rodiny napriek tomu, že vykonávajú odlišné alebo prekrývajúce sa funkcie. Proteín p73 slúži k aktivácii regulačných génov *TP53*, čo má za následok potlačenie rastu buniek alebo slúži k vyvolaniu apoptózy – bunkovej smrti. Taktiež, expresia p53 a p73 je indukovaná poškodením DNA – hoci odlišnými mechanizmami [21]. p53 sa vyskytuje až v 70 % nádorov [22]. Na rozdiel od proteínu p53, p63 a p73 sú veľmi zriedkavo prítomné v mutantnej forme v ľudských rakovinových bunkách. Vo výnimočných prípadoch sa mutantný gén *TP63* vyskytuje u detí, ktoré trpia napr. ektoaktíviou [23]. Mutp73 sa nachádza v neuroblastóme alebo v jednom z podtypov T-bunkového lymfómu [19, 24].

2.1.2 Funkcia p53

Tumor supresorové proteíny sa podieľajú na udržovaní homeostázy tkaniva – kontrolujú počet a správanie buniek v jednotlivých tkanivách v organizme [25]. Za týmto účelom zvyčajne regulujú jednu, alebo viacero životných funkcií, ktoré zamedzujú aberantnému (atypickému) šíreniu nádorov [26, 27]. Medzi najčastejšie funkcie p53 patrí: bunkové starnutie, zastavenie bunkového cyklu a riadená bunková smrť. p53 je najrozšírenejší nádorový supresor reagujúci na rôzne formy bunkového stresu, kedy sprostredkováva celú škálu antiproliferačných procesov a funkcií, a preto nie je prekvapujúce, že je *TP53* najbežnejšie inaktívovaný tumor supresorový gén v ľudských rakovinových bunkách. Poškodenie DNA, hypoxia alebo aberantná expresia onkogénu sú len jedny z mála príčin inaktívácie p53 alebo jeho funkcií [25, 28].

Jednou z funkcií proteínu p53 je senescencia (bunkové starnutie). Štúdie ukázali, že senescencia u ľudí je spôsobená skrátením telomér [29]. Tiež spôsobuje morfológické zmeny buniek, ako napr. bunkové zväčšenie a zvýšenie syntézy lyzozómov. Ľudské bunky sú ovplyvňované bunkovým starnutím, keď je veľkosť telomér redukovaná na 4 – 7 kb [30]. Bunkovú senescenciu môže vyvolať nadmerná expresia niektorých supresorových génov (napr. inhibítor p16 cyklín-dependentná kináza (CDKI) alebo proteín promyelocytovej leukémie (PML)). Počas bunkovej senescencie je dočasne zvýšená hladina p53 a takisto je zvýšená DNA väzbová aktivita a transkripčná aktivita tohto proteínu [31]. Proteín p53 je schopný inhibovať transformáciu buniek pri abnormálnych situáciách a stimuloch. Pri poškodení DNA dochádza pri väčšine organizmov k zastaveniu bunkového cyklu vo fáze G1/S, G2/M. Kontrolný uzol G1/S dokáže potlačiť replikáciu pri poškodení DNA templátu. Jeho vplyv môže viesť k pozastaveniu, resp. spomaleniu bunkového cyklu a k inhibícii proliferácie buniek s poškodenou DNA [10, 32]. Nedostatok p53 v bunke môže meniť priebeh bunkového cyklu (spomalenie) a amplifikáciu génov zmenou progresie bunkového cyklu [32].

Proteín p53 je schopný spúšťať kontrolné body, ktoré umožňujú bunke s poškodenou DNA prejsť z G1 fázy do S fázy bunkového cyklu. Pri tomto procese sa využíva proteín p21^{WAF/CIP1} – transaktivačný cieľový gén pre p53, ktorý inhibuje funkcie komplexu cyklínu a bunkový rast. Medzi ďalšie úlohy pomocného proteínu p21^{WAF/CIP1} patrí: kontrola S fázy prevenciou DNA replikácie; zastavenie bunkového cyklu v G1 fáze zabránením fotofosforylácie retinoblastomového proteínu (pRb) – substrátu pri tvorbe CDK2; znemožnenie vstupu bunky do mitotickej fázy kombináciou cyklínu A a B [33, 34].

Ďalšou odpoveďou bunky na poškodenú DNA je apoptóza – riadená bunková smrť. Apoptóza je komplexný proces pozostávajúci z najmenej dvoch hlavných ciest (vonkajšia a vnútorná), pričom každá je regulovaná na viacerých úrovniach. Vonkajšia cesta pozostáva z receptorov povrchu buniek, ich inhibičných činiteľov a príslušných cytoplazmatických proteínov, ktoré môžu byť modulované zmenou počtu receptorov v závislosti na citlivosti buniek k rôznym ligandom. K vonkajšej regulácii sa takisto zahŕňa level expzie aktivovaných ligandov a cytoplazmatických molekúl (napr. FADD), ktoré sú potrebné k aktivizácii prokaspáz po naviazaní ligandu a molekuly inhibujúcej smrť (napr. FLIP) [35]. Vnútorná cesta je lokalizovaná na mitochondriách a zahŕňa kľúčové apoptogénne faktory (napr. cytochróm c) [36]. Hlavnými regulátormi vnútornej cesty sú členovia rodiny Bcl-2 – Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-Xs a BAX. [37]. Tieto proteíny sú lokalizované na vonkajšej membráne mitochondrií, kde napomáhajú sekrecii faktorov vnútornej cesty. Látky schopné kontrolovať súčasne vnútornú aj vonkajšiu dráhu sú inhibítory apoptických proteínov (IAPs) [38].

2.2 Mutantný proteín p53

V približne 50 % prípadov ľudskej rakoviny dochádza k mutácii p53. Ďalších 20 % sú prípady so zachovanými alelami pre typ p53 a k defektom dochádza pri iných zložkách regulačných dráh proteínu p53 [39]. Mutácie znemožňujú oligomerizáciu, a preto mutp53 nevytvára diméry [17]. Mutácie vo väčšine tumor supresorových génov spôsobujú stratu produkcie daných proteínov, alebo tvorbu ich skrátených, resp. nestabilných foriem. Na rozdiel od väčšiny tumor supresorových génov sa *TP53* bodové mutácie, produkujúce bielkoviny s pôvodnou dĺžkou, zvyknú vo vysokých koncentráciách zhromažďovať v nádorových bunkách [40, 41]. Najčastejšie bodové mutácie proteínu p53 sú lokalizované v 6 miestach – „hotspotoch“, ktoré sa nachádzajú v DNA väzbovej doméne, kde narúšajú transkripčnú aktivitu [42]. Vo všeobecnosti je možné rozdeliť mutácie p53 do dvoch skupín – DNA kontaktné a konformačné mutácie [43].

2.2.1 Typy p53 mutácií

2.2.1.1 DNA kontaktné mutácie

Prvá skupina pozostáva z DNA kontaktných mutácií, ako napr. p53^{R273H} a p53^{R248Q} [44]. K mutáciám dochádza v oblasti, ktorou sa p53 priamo viaže k DNA (DBD doména) [43].

Mutantný proteín p53^{R273H} podporuje proliferáciu rakovinových buniek a zvyšuje odolnosť voči „anoikis-u“ rakovinových buniek („anoikis“ – forma programovateľnej bunkovej smrti, ktorou sú postihované ECM (extracelulárna matrix) závislé bunky pri oddelení od ECM). Vzhľadom na tieto poznatky má p53^{R273H} nasledujúce funkcie:

- Podporuje proliferáciu buniek rakoviny (napr. prsníka) potlačením mitochondriálnej apoptickej dráhy,
- Potláča expresiu Bcl-2 modifikačných faktorov (BMF), čím zabráňuje apoptóze [45].

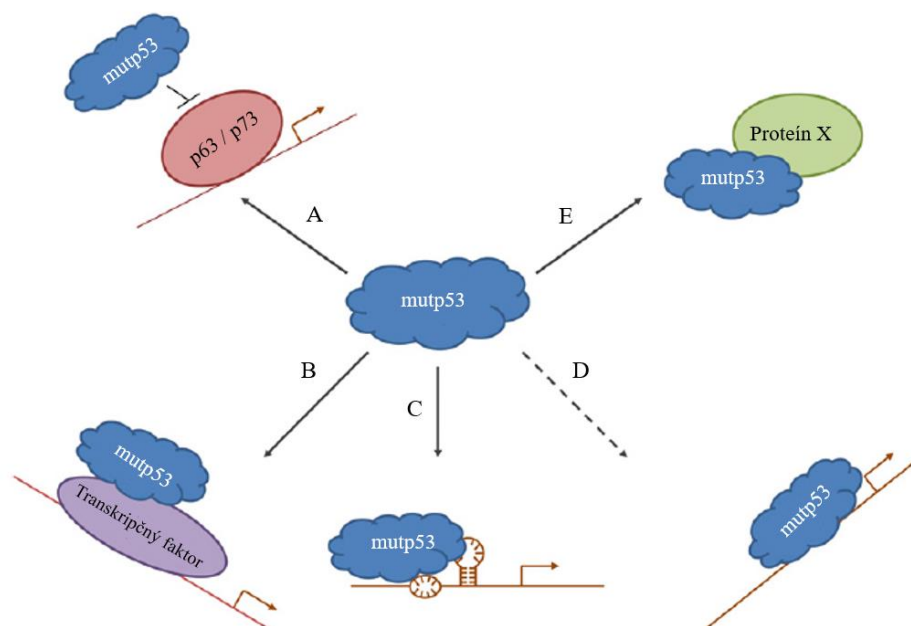
2.2.1.2 Konformačné mutácie

Druhá skupina je tvorená konformačnými mutáciami, ako sú napr. p53^{R175H} a p53^{H179R} [44]. Konformačné mutácie spôsobujú úplné (globálne) alebo miestne špecifické (lokálne) skreslenie správneho zloženia DBD domény proteínu p53 [43]. Z pomedzi všetkých známych mutantov a variácií sa mutant p53^{R175H} najčastejšie vyskytuje pri ľudskej forme rakoviny a vo väčšine prípadov je spojený so zlou prognózou a s vysokou chemorezistenciou. Mimo iné je tento mutant schopný negatívne ovplyvňovať funkciu členov rodiny p53, pretože s nimi vytvára vysoko afinitné komplexy a potláča ich nádor-potláčajúce funkcie [46].

2.2.2 Zisk nových proteínových funkcií – GOF

Unikátnou vlastnosťou mutp53 je zisk nových proteínových funkcií – GOF (z angl.: „gain of function“) (obrázok 2), ktoré nadobúdajú jeho onkogénne funkcie nezávislé na strate aktivity p53 [47, 48]. Prvý prípad p53 GOF bol pozorovaný v bunkách označovaných *TP53*-null (bunky neobsahujúce *TP53* gén), ktoré boli transfekované vektorom s obsahom mutantného génu pre mutp53 so zvýšenou expresiou. Po vpravení daných vektorov do pokusných myší dochádzalo k vytvoreniu lokálnych nádorov, ktoré časom ustúpili, zatiaľ čo mutantný vektor vytváral nádory nezlučiteľné so životom [49]. Pri testovaní p53 GOF *in vivo* vykazovala prítomnosť vektoru väčšiu šancu vzniku metastáz, pričom navyše dochádzalo k vzniku nových typov nádorov [50, 51]. Mechanizmy odpovedajúce p53 GOF zahŕňajú: zvýšenú proliferáciu, angiogézu, invazívnosť, inhibíciu apoptózy a chemoterapeutickú rezistenciu [47].

Niektoré mutp53 stratili schopnosť aktivovať cieľové gény transkripčného faktora p53. Rakovinové bunky získavajú selektívne výhody tým, že si zachovávajú formu mutp53. Mutanty p53 môžu meniť veľkosť a tvar transkriptómu a proteómu nádorových buniek vytvorením nových väzieb s transkripčnými regulátormi, enzýmami a inými bunkovými proteínmi [52, 53]. Špecifické bodové mutácie narúšajú bunkové procesy, schopnosť prežitia, migráciu, metastázu a chemorezistenciu [54, 55].



Obrázok 2: Mechanizmus GOF mutp53; (A) Interakcia s rodinou p53 s cieľom inhibície transaktívácie ich cieľových génov; (B) Interakcia s transkripčnými faktormi vyvoláva transaktíváciu nových cieľových génov; (C) Špecifická väzba s DNA vedie k transkripčnej regulácii promótoru; (D) pripojenie mutp53 do unikátnej sekvencie DNA alebo na chromatín (prerušovaná šípka naznačuje hypotézu, ktorá zatiaľ nebola plne potvrdená); (E) Novovzniknuté interakcie s bunkovými proteínmi, ktoré nie sú transkripčné faktory [56].

2.2.3 Proonkogénna úloha

Proonkogénna úloha mutantného proteínu p53 je popísaná viacerými mechanizmami. Prvý druh zahŕňa selektívnosť nádorov. Nádory môžu potlačiť aktivitu p53, čo spôsobuje významnú predispozíciu pre vznik nádorových ložísk. Okrem 75 % mutp53, ktoré vznikli bodovými mutáciami existuje ďalších 15 %, ktoré obsahujú posun čítacieho rámca alebo vytvárajú nezmyselné mutácie [56]. Nezmyselné mutácie môžu vyvolať predčasný STOP kodón alebo bodovo-nezmyselný kodón v transkribovanej mRNA [57].

Druhý druh predstavuje mutp53, ktoré stratili určité nádor-potláčajúce funkcie p53, pričom si niektoré aspekty ponechali. Bunkové testy v kvasinkách a cicavčích bunkách ukázali pozoruhodnú zložitosť v schopnosti mutp53 aktivovať transkripciu zo štandardného p53 responzívneho elementu [58].

2.2.4 Modulácia metabolizmu

Rakovinové bunky potrebujú pre svoj rast najrôznejšie metabolické procesy a energetické požiadavky, ktoré vyžadujú dostatok zásobných látok [59]. Úloha p53 je v regulácii metabolizmu dobre zdokumentovaná a zahŕňa potláčanie Warburgového efektu (modifikovaný bunkový metabolizmus rakovinových buniek, ktoré majú tendenciu uprednostňovať špecializovanú fermentáciu pred aeróbnym dýchaním [60]), riadenie odpovedí na prítomnosť glukózy, lipidov a aminokyselín [61]. Mutp53 moduluje metabolizmus rakovinových buniek niekoľkými spôsobmi:

- Mutp53 uľahčuje stresovú reakciu rakovinových buniek na „hlad“ (v dôsledku vyčerpania metabolitov) aktiváciou kanonických transkripčných cieľov p53 – najmä p21 [62]. Mutp53

môže zmierňovať hladovanie buniek napr. inhibíciou regulátora AMP kinázy, alebo zlepšením odpovede na nedostatok glutamínu [63]. Okrem toho je mutantný proteín takisto zapojený do akumulácie nevyhnutných metabolitov pre onkogénne vlastnosti nádorových buniek (mutp53 reguluje množstvo lipidov – kyselina lysosfosfatidová (LPA), použitím degradujúcich enzýmov pri rakovine vaječníku HGSOV (z angl.: „High-grade serous ovarian cancer“) [64].

- Mutp53 moduluje metabolizmus rakovinových buniek indukovaním mevalonátových ciest. Mutantný proteín zvyšuje hladinu génov pre túto cestu, zatiaľ čo mevalonátová cesta je kritickým modulátorom stability a regulácie génov mutp53 – statíny, vytvárajúce sa ako inhibítory enzýmov v mevalonátovej dráhe, zoslabujú mutp53 GOF účinky [65, 66].
- Proteín NRF2 (z angl.: „the nuclear factor erythroid 2–related factor 2“) sprostredkúva metabolické deje pre mutp53. Jedným z metabolických účinkov je odpoveď na oxidačný stres. Vysoká hladina reaktívnych kyslíkových spécií (ROS) je pre väčšinu buniek toxická, ale prospešná pre rakovinové bunky. Zvýšená hladina ROS aktivuje rôzne signálne dráhy podporujúce proliferáciu a prežitie nádorov. Agresivita nádorových buniek a nepresné diagnózy u pacientov súvisia so zvýšenou hladinou ROS a oxidačným stresom [67]. Mutp53 zvyšuje hladinu ROS inhibíciou expresie ROS detoxikačných enzýmov cez zníženie produkcie proteínu NRF2 [68].
- Ďalším pozoruhodným metabolickým účinkom sprostredkovaným mutp53 je zosilnenie Warburgového efektu zvýšením príjmu glukózy cez glukózový transportér GLUT1 [69], ako aj zvýšenie glykolytickej aktivity a zníženie oxidačnej fosforylácie v mitochondriách. Zvýšenie oxidačno-fosforylačnej aktivity vedie k väčšej invázivnosti a metastatickému potenciálu [70].

2.2.5 Stabilizácia mutp53 v nádorových bunkách

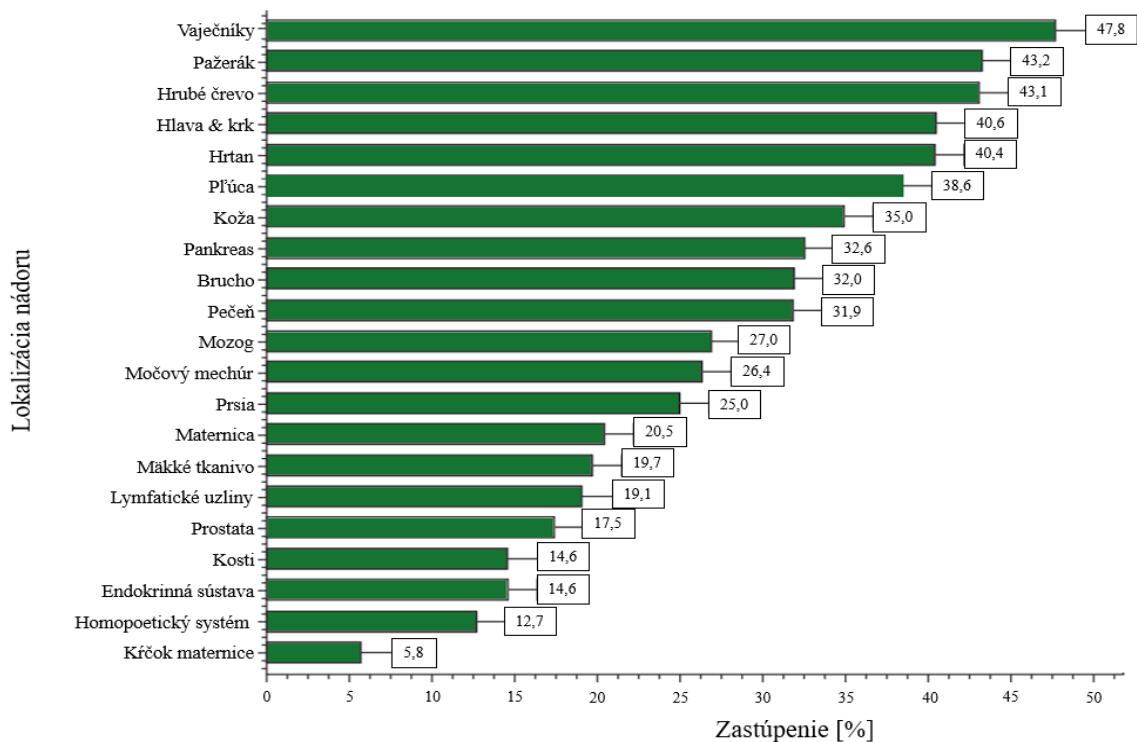
P53 sa udrzuje na nízkej hladine vo väčšine buniek predovšetkým v dôsledku prísnej regulácie prostredníctvom MDM2 E3 ubikvitín ligázou, čím sa vytvára slučka negatívnej spätnej väzby. Mutantné formy p53 sú pomerne stabilné a často sa hromadia vo vysokých koncentráciách v nádorových bunkách [71]. Až do nedávna prevládala hypotéza, že práve mutp53 (a ich vysoké hladiny) narúšajú pôsobenie spätoväzbovej slučky, a preto mutp53 nie je schopný transaktivovať MDM2 [72]. Argumentom proti tejto hypotéze je skutočnosť, že vo všetkých tkanivách v myšacích modeloch, ktoré obsahovali mutantnú alelu, nedochádzalo k hromadeniu mutp53 v normálnych tkanivách [50, 51]. K mutácii p53 v myšiach dochádzalo pri modeloch, ktoré neobsahovali MDM2 – vtedy bola forma p53 stabilizovaná v niektorých normálnych tkanivách [73]. Zistenia naznačujú, že hladina mutp53 môže byť regulovaná podobnými mechanizmami ako hladina p53 typu wt v myšacích modeloch. Napriek použitiu podobných mechanizmov dochádza k hromadeniu mutp53 v dôsledku ďalších dejov, ktoré môžu nastať v priebehu tumorogenézy [56].

2.2.6 Typy mutácií TP53 v ľudských nádoroch

2.2.6.1 Somatické mutácie

Somatické TP53 mutácie sa vyskytujú skoro pri každom type rakoviny – najčastejšie v rakovine vaječníkov, pažeráku, hrubého čreva alebo konečníka (obrázok 3). Mutácie

sú častejšie v pokročilých štádiách, alebo v niektorých agresívnych podtypoch rakoviny (ako napr. trojitý negatívny karcinóm a HER2-zosilená rakovina prsníka) [72, 73].



Obrázok 3: Prehľad somatických mutácií TP53 a ich percentuálne zastúpenie v nádoroch [44].

Pri rakovinách s nízkou mierou mutácie je p53 inaktívovaný alternatívnymi mechanizmami (napr. rakovina krčka maternice – degradácia mutp53 vplyvom ľudského papilomavírusu HPV proteínom E6) [74]. Somatické mutácie sú z 86 % lokalizované medzi AMK 125 – 300 v DNA väzbovej doméne a v tejto oblasti prevládajú bodové mutácie (87,9 %). Bodové mutácie sa vyskytujú aj mimo DBD domény, kde tvoria len 40 %, pričom majoritné sú nezmyselné a posunové mutácie. 25 % jedno-bázových substitúcií predstavuje substitúcia C:G > T:A v CpG oblastiach (oblasti DNA, kde za cytozínovým nukleotidom nasleduje guanínový v smere 5' → 3'). CpG dinukleotidy mutujú 10-krát častejšie než ostatné kombinácie dinukleotidov [75]. V DBD doméne sa nachádza celkovo 22 CpG, z čoho sú 3 „hotspoty“ zodpovedné približne za 60 % mutácií. Ďalších 26 % mutácií je spôsobených piatimi AMK rezíduami (196, 213, 245, 282 a 306). K substitúcii v CpG oblasti dochádza v obmedzenej miere, a preto sú tvorené funkčné proteíny. Aj keď rovnaké CpG „hot-spot“ mutácie sa nachádzajú v mnohých typoch nádorových buniek, iné typy mutácií majú tendenciu vykazovať rozdiely medzi rakovinami. Rozdiely môžu byť spôsobené rôznym účinkom špecifických mutagénov a environmentálnym zložením [74].

2.2.6.2 Mutácie zárodočnej línie: Li-Fraumeni syndróm

TP53 mutácie zárodočnej línie spôsobujú Li-Fraumeniho syndróm (LFS) – vysoký výskyt nádorov so skorým nástupom vrátane sarkómov, rakoviny prsníka, mozgových nádorov a nadobličkových kortikálnych karcinómov [75, 76]. Do roku 2008 bolo identifikovaných len niečo cez 500 rodín, resp. jedincov s celým LFS syndrómom, alebo s čiastočným LFS syndrómom – LFL (z angl.: „Li-Fraumeni-like“). LFS/ LFL je stále vzácnym syndrómom [40, 77]. TP53 mutácie zárodočných línií prispievajú k viac ako 17 % zo všetkých doposiaľ

známych rakovín zárodočných mutácií. Najčastejšie je možné nájsť mutácie zárodočných línií u rakoviny prsníka, mäkkých tkanív, kostí a pri mozgových nádoroch [78]. Distribúcia zárodočných mutácií je podobná somatickým mutáciám. Najpravdepodobnejšie sú nezmyselné mutácie v rovnakých „hot-spotoch“ (77 %). V 54 % prípadov sú detegované CpG mutácie [79].

2.2.6.3 *TP53 polymorfizmus*

V ľudskej populácii bolo identifikovaných cez 80 *TP53* polymorfizmov. 90 % prípadov je lokalizovaných v intrónoch, mimo spojovacie miesta a v nekódujúcich exónoch. Rozlišuje sa 18 exonických polymorfizmov s jedným nukleotidom (SNP): 5 tichých, 7 lokalizovaných po STOP kodóne v exóne 11. Štyri exonické polymorfizmy menia proteínovú sekvenciu a majú len malé účinky na transaktiváciu [80].

V217M je jediným netichým polymorfizmom v DBD doméne. Vo funkčných kvasinkových testoch vykazuje zvýšenú transaktiváciu niektorých p53 responzívnych elementov (napr. inhibítor cyklín-dependentnej kinázy 1 (CDKN1A) a Bcl-2 asociovaný X proteín (BAX)), ktoré napomáhajú chrániť bunky pred rakovinou. V tetramerizačnej oblasti sa nachádza polymorfizmus G360A, ktorý naopak znižuje transaktivačnú aktivitu, čo zvyšuje pravdepodobnosť vzniku rakoviny. Celkový dopad vymenovaných SNP ešte nebol úplne potvrdený klinickými alebo epidemiologickými štúdiami [42].

Ďalšie polymorfizmy môžu ovplyvňovať napr. fosforyláciu (zosilňuje p53 riadenú apoptózu) [79, 80], väzbu k DNA a aktiváciu leukemického inhibičného faktoru [81].

2.2.7 Terapeutický prístup k mutp53

2.2.7.1 *Obnova wt aktivity*

Proteín p53 je induktor apoptózy a bunkového starnutia v poškodených bunkách. V nádorových bunkách dochádza k reaktivácii niektorej úrovne funkcií p53. Strata určitých funkcií p53 môže byť opravená ďalšími bodovými mutáciami, čo napomáha stabilizovať konformáciu p53, a preto bola štruktúra p53 označená ako vnútorne reverzibilná [82].

Niektoré mutanty, ako mutant Y220C, môžu byť stabilizované naviazaním malých molekúl (napr. 1-(9-etyl-9H-karbazol-3-yl)-N-methylmetamín – PhiKan083 a 1-methyl-4-fenyl-3-(1H-pyrol-1-yl)-1H-pyrazol – PK7088). Molekuly stabilizujú štruktúru mutp53 a napomáhajú zvyšovať koncentráciu a aktivitu wt [81, 82].

PRIMA-1 a jej rozpustné deriváty sa využívajú pri viacerých p53 mutantných proteínoch, interagujú s DNA väzbovou doménou, odkiaľ podporujú správne skladanie mutp53 a obnovujú funkcie p53 [83, 84, 85].

P53 vyžaduje na vytvorenie DNA-väzieb kovové ióny Zn^{2+} . Určité mutanty nie sú schopné ukladať a interagovať s intracelulárnymi zinkovými promótorami, čo narúša ich výslednú konformáciu. Mnohonásobným prídavkom zinku je možné aspoň čiastočne prinavrátiť pôvodné funkcie proteínu [86, 87].

2.2.7.2 *Podpora degradácie mutantnej formy p53*

Wt aj mutp53 sú atakované proteozomálnou degradáciou v inak normálnych bunkách ubikvitínovou ligázou MDM2. Inhibícia MDM2 v reakcii na stres je základ aktivácie p53, avšak to môže viesť k nadmernej expresii mutp53 v rakovinových bunkách [88].

Autofágia hrá tiež dôležitú rolu v degradácii mutp53, môže podporovať a inhibovať vývoj nádoru. Makroautofágia je proces, pri ktorom intracelulárny obsah buniek je pohlcovaný

a odbúravany prostredníctvom lyzozómov [89]. Makroautofágia vyvolaná glukózovou restrikciovou selektívne degraduje mutp53, zatiaľ čo dochádza k stabilizácii p53 za rovnakých podmienok [90].

2.2.7.3 Oplyvňovanie regulačných dráh mutp53

Namiesto priameho zacielenia na mutp53 je dostupný aj iný prístup: identifikovať charakteristické črty v mechanizmoch a ovplyvniť regulačné cesty mutp53. Interakcie mutp53 s p63/p73 sú považované za dôvod proonkogénnych účinkov mutp53. RETRA (reaktívatory aktivity transkripčného reportéra) sú malé molekuly, ktoré dokážu narúšať komplex mutp53:p73, čo umožňuje proteínu p73 aktivovať transkripciu z RETRA konštruktu. Táto zlúčenina je tiež schopná aktivovať transkripciu p53 cieľových génov *in vivo* nádoroch s mutp53 a zabrániť rastu nádorových buniek [91].

Bolo preukázané [91], že môže dôjsť k narušeniu aktivity, keď sú bunky s mutp53 zbavené p73 pomocou interferenčnej RNAi a prídavku RETRA.

2.3 Transaktivácia mutp53

Väčšina bodových p53 mutácií v DNA väzbovej doméne narúša schopnosť transaktivovať zvyšné gény, ktoré sú za normálnych podmienok transaktivované pomocou p53. Podiel mutácií v *TP53* je omnoho vyšší ako u iných tumor supresorových génov, čo naznačuje, že transaktivácia mutantov p53 spôsobuje čiastočné výhody bunkám, ktoré ju exprimujú [25].

Nádor supresorová funkcia proteínu p53 odpovedá transkripčnej aktivite promótorov, ktoré obsahujú p53 väzbové miesta. Pri pokuse [92] boli skúmané schopnosti mutp53 transaktivovať nepoškodené cieľové promótor proteínu p53 – p21, MDM2 [26], za použitia reportérovej analýzy. Experimentom bolo preukázané:

- schopnosť p53 mutantov transaktivovať p53 indukčibilné promótor je malá a dochádza len k nepatrnej transaktivácii promótorov,
- niektoré mutanty majú aktivitu podobnú p53 vo výrazne obmedzenej miere alebo na transaktiváciu môžu používať iné molekulárne mechanizmy [92].

2.4 Väzba mutp53

TP53 mutantné spektrum je ovplyvnené bodovými mutáciami v „hotspotoch“ centrálnej doméne proteínu p53, nevyhnutné pre vytvorenie sekvenčne špecifickej DNA väzby (SSDB – z angl.: „sequence-specific DNA binding“). *TP53* „hotspot“ mutácie nemôžu ovplyvniť transkripciu cez väzbu k špecifickým miestam RE. Kanonické p53-RE sa zvyčajne skladajú minimálne z dvoch dekamérov (5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3') [93].

Druhou oblasťou, ktorá proteínu p53 poskytuje väzby k DNA je C-koncová doména. Väzbové aktivity C-koncovovej domény sú založené na rozpoznaní cieľovej DNA pomocou charakteristických štruktúrnych prvkov a nie na vyhľadávaní určitých sekvenčných motívov. Väzbové miesta v tejto oblasti sa pre jednoduchosť a rozlíšenie od kanonických p53-RE označujú ako nekanonické [94].

Určité špecifické interakcie mutp53 s DNA sú realizované v dvoch režimoch. Prvý zahŕňa vnútornú DNA väzbovú aktivitu mutp53, čo vytvára priamu väzbu. Druhý prístup je sprostredkovaný interakciou mutp53 s DNA väzbovými proteínmi – pasívne cielenie, resp. nepriame spojenie [95].

2.4.1 Nepriame spojenie mutp53 s DNA

Sekvenčné motívy sprostredkujúce transkripčnú reguláciu mutp53 naznačujú, že špecifické mutp53-RE môžu existovať. Avšak genomické sekvencie mutp53 sú heterogénne a zdá sa, že proteíny sa spájajú s chromatinom odlišnými spôsobmi, ktoré sa zakladajú buď na vnútornej väzbovej aktivite DNA samotných mutp53, alebo môžu byť sprostredkované prostredníctvom interakcie mutp53 s inou DNA väzbovou jednotkou [96].

Nedostatok sekvenčných homológov medzi mutp53-RE možno čiastočne vysvetliť a to tak, že špecifickosť združenia mutp53 s DNA bude určená DNA väzbovou špecifitou ďalších faktorov, ktoré interagujú s proteínmi mutp53. V skutočnosti, niekoľko väzbových partnerov mutp53 predstavuje sekvenčne špecifické DNA väzbové transkripčné faktory, ktoré rozpoznávajú určité úseky v DNA. Spojenie mutp53 s určitými promótorami sa zdá byť prevažne určené väzbovými vlastnosťami DNA interagujúcich partnerov [96, 97].

Výsledok spojenia p53, resp. mutp53 s RE interagujúcich partnerov je diametrálne odlišný. Interakcie s niektorými onkogénnymi transkripčnými faktormi sú príkladom inverzných funkcií. Sekvenčne špecifické transaktivátory v regulácii rakovinových génov Ets-1 a NF-Y [98, 99] sa ukázali ako dôležité zložky transkriptómu mutp53. Väzba p53 s Ets-1 inhibuje transkripčnú aktivitu p53, zatiaľ čo spojenie Ets-1 s mutp53 podporuje rakovinové bujnenie, resp. rozširuje transkripciu rakovinových génov [100]. Všetky interakcie si vyžadujú C-koniec p53, kde sa nachádzajú väzbové miesta pre Ets-1, NF-Y, ale aj pre ostatné gény kódujúce DNA väzbové proteíny [101].

„Hotspot“ mutácie sa vyskytujú v centrálnej doméne p53, pričom zanechávajú C-koniec bez zmeny. Vplyvom „hotspot“ mutácii dochádza k zmene príspevkov interakcií s DNA v prospech interakcií s C-koncom u mutantov p53. Vznikajúca nerovnováha spôsobuje stratu, resp. zníženie aktivity p53-SSDB, čo v rakovinových bunkách zvyšuje expresiu mutp53 a aj väzbových partnerov, ktorí sú zodpovední za onkogénnu aktivitu [95].

2.4.2 Priama väzba mutp53 s DNA

Priama väzba mutp53 k DNA je ďalším kľúčovým faktorom onkogénnej aktivity mutp53, ktorá je reprezentovaná viacerými režimami. Jeden režim je odvodený od p53-SSDB aktivity, ktorá je ovplyvnená nerovnomerne rôznymi mutáciami a podlieha zvyškovej p53 podobnej transkripčnej aktivite v niektorých p53 mutantoch [102].

Výrazne odlišným spôsobom interakcie je schopnosť mutp53 sa viazať priamo na DNA v nelineárnej konformácii [103].

Režim DSSB (z angl.: „DNA structure-selective binding“) je funkčný v podmienkach *in vitro*, kedy sú mutp53 proteíny permanentne vystavené umelým konštruktom DNA. Svoju funkčnosť preukazuje DSSB aj v podmienkach *in vivo*, kde dochádza k väzbe so štrukturálne flexibilnými genomickými sekvenciami [104].

Rôzne sekvencie (napr. trinukleotidové (CTG-CAG) opakovania, MAR/SAR sekvencia) boli identifikované ako genomické väzbové ciele mutp53 v režime p53-DSSB [103]. Napriek tomu, že funkčný význam týchto interakcií je zatiaľ nepochopený, ich štruktúrna flexibilita sekvencií poskytuje dôkaz, že selektívna väzba k nelineárnej DNA je princíp rozpoznania DNA proteínmi mutp53. Schopnosť mutp53 viazať nekanonické DNA štruktúry, ktoré sú tvorené CTG-CAG, nie je unikátna práve pre mutp53, ale je odvodená od zdedenej DSDB (z angl.:

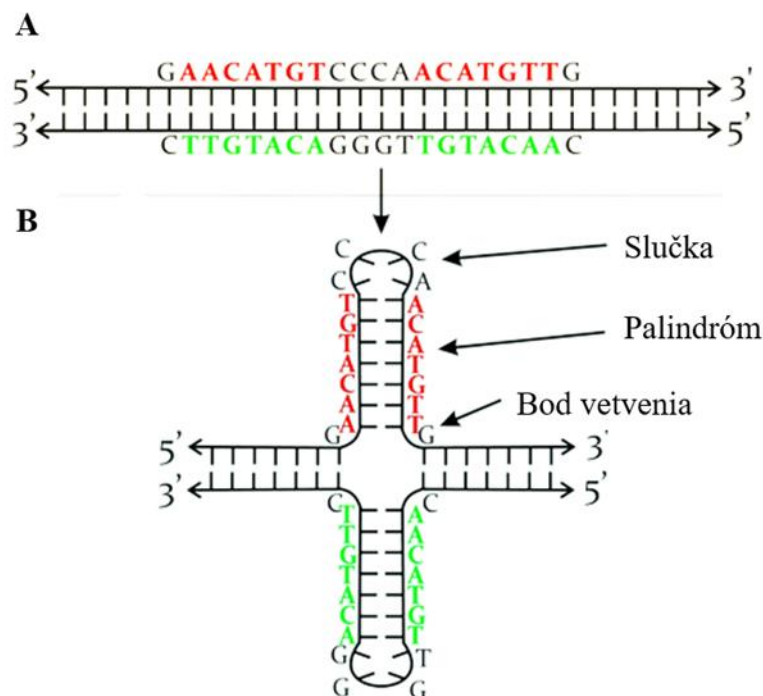
„DNA structure-dependent binding“) aktivity p53 [104, 105]. Zistenie, že p53 a mutp53 sa viažu na charakteristické miesta (CTG-CAG) v DSSB režime, môže poskytovať informácie o možnom spojení p53 s neurodegeneratívnymi chorobami [106, 107].

2.4.3 Lokálne štruktúry DNA

Štruktúra B-DNA bola prvýkrát predstavená v roku 1953 dvojicou Watson a Crick, ktorí ju popísali ako dvojláknovú pravotočivú závitnicu s komplementárnymi vláknami [108]. Postupne boli objavované aj ďalšie DNA štruktúry, ktoré obsahovali aj iné formy DNA a nápadne sa líšili od kanonickej B-DNA štruktúry. Lokálne štruktúry DNA bez náznaku klasickej pravotočivej dvojzávitnice sa v genóme všetkých organizmov vyskytujú častejšie než sa prvotne predpokladalo. Zohrávajú významnú úlohu pri regulácii základných biologických funkcií. Negatívne nadzávitnicové vinutie a väzby k proteínom zvyšujú stabilitu lokálnych konformácií alebo indukujú konformačné zmeny, čo môže podmieniť vznik rôznych DNA štruktúr – križové štruktúry, ľavotočivá DNA (Z-DNA), triplex, kvadruplex at. [109].

2.4.3.1 Križová štruktúra

Križová štruktúra (z angl.: „cruciform“) je DNA štruktúra, ktorá je podmienená prítomnosťou inverzných repetícií v sekvencii nukleovej kyseliny. Inverzné repetície sú tvorené jednou palindromickou sekvenciou na jednom vlákne, ktoré sa v opačnom smere opakuje v inom mieste na vlákne. Na základe komplementarity reťazcov dochádza k vytvoreniu vodíkových väzieb medzi dusíkatými bázami palindrómov. Pri vytvorení spojenia dochádza ku vzniku jednovláknovej slučky, ktorej veľkosť závisí na veľkosti medzery medzi palindrómami (obrázok 4) [110]. Križové štruktúry ovplyvňujú nadzávitnicové vinutie, pozíciu nukleozómu v bunke, vytváranie a stabilizáciu ostatných sekundárnych štruktúr DNA [111].

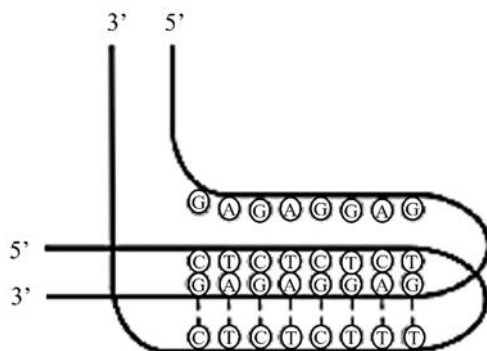


Obrázok 4: Vznik križovej štruktúry; (A) lineárna DNA s palindrómami o veľkosti 7 bp; (B) štruktúra, ktorá obsahuje bod vetvenia, palindróm, slučka [112].

2.4.3.2 Triplex

DNA triplex, na rozdiel od B-DNA, obsahuje tri reťazce DNA, pri ktorých dochádza k párovaniu báz na základe Watson-Crickového a Hoogsteenového modelu [113]. DNA triplexy sa ďalej delia na intramolekulárne, kde tretí reťazec pochádza z rovnakého DNA duplexu, a intermolekulárne, kde tretí reťazec pochádza z iného DNA duplexu. V oboch prípadoch dochádza k väzbe tretieho reťazca do veľkého žliabku DNA duplexu a vzhľadom k orientácii tretieho reťazca je možné triplexy rozlišovať na paralelné alebo antiparalelné [114]. Intramolekulárny triplex, nazývaný aj H-DNA (obrázok 5) vzniká v sekvencii s homopurínovými a homopyridínovými opakovaniami. Väčšina stôp homopurín-homopyridínovej DNA je lokalizovaná v intrónoch, promótoroch, v 5' a 3' nepreložených regiónoch [115].

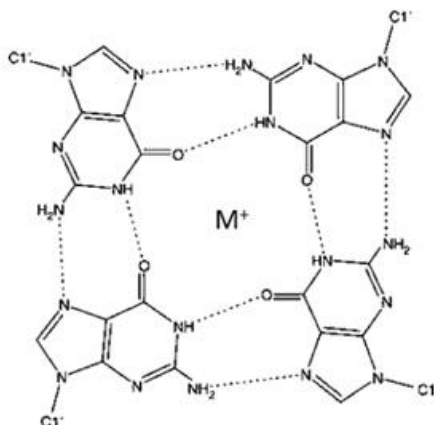
V porovnaní s DNA duplexmi sú triplexy relatívne nestabilné, kvôli zníženému počtu vodíkových väzieb a elektrostatickému odpudzovaniu v záporne nabitej fosfátovej štruktúre. Stabilitu je možné zvýšiť prítomnosťou Mg^{2+} kationov, ktoré znižujú elektrostatické odpudzovanie [116].



Obrázok 5: Schéma H-DNA [117].

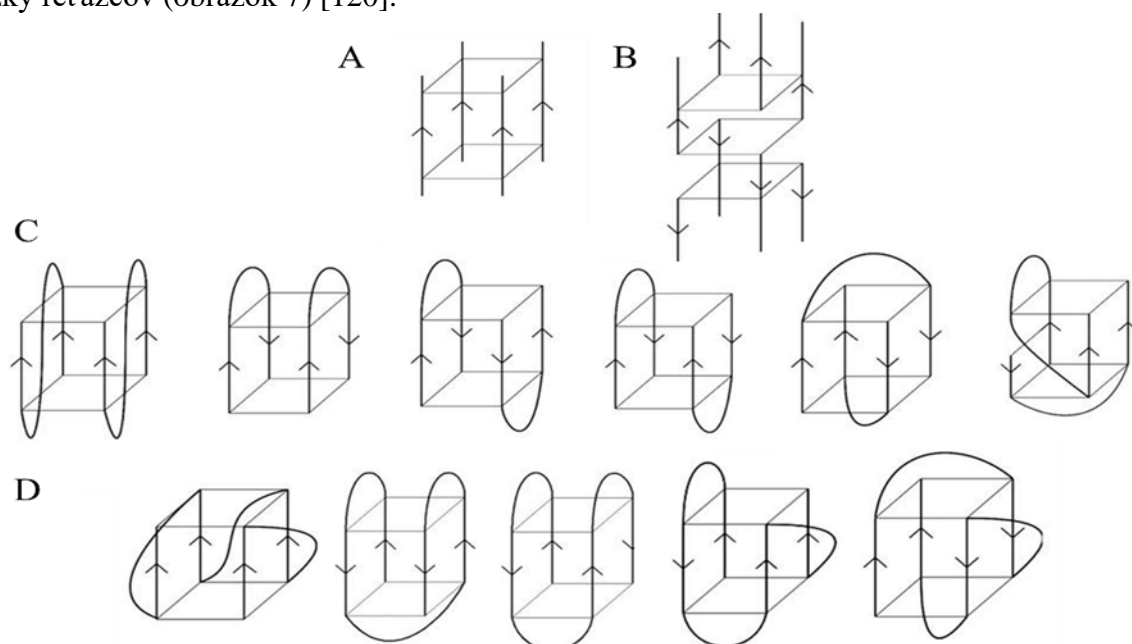
2.4.3.3 Kvadruplex

V roku 1962 bolo prvýkrát predstavené tetramerické guanínové zoskupenie kryštálografickou metódou [118]. Kvadruplex (G4) je nekanonická sekundárna štruktúra DNA, ktorá sa vytvára z planárnych plátov guanínových kvartetov. G-kvartet (obrázok 6) je tvorený z centrálnemu kationu M^+ (napr. K^+ , Na^+ , Li^+) a 4 molekúl guanínu, ktoré sú stabilizované H-väzbami pomocou Hoogsteenového párovania báz [119].



Obrázok 6: G-kvartet; vodíkové väzby označené prerušovanými čiarami, M^+ – centrálny kation [120].

G4 môžu byť unimolekulárne a intermolekulárne – tetramolekulárne, bimolekulárne, a taktiež vykazujú topologickú rozmanitosť, ktorá vyplýva z rôznych kombinácií smerov a dĺžky reťazcov (obrázok 7) [120].



Obrázok 7: Najčastejšie topológie G4 štruktúr; (A) tetramolekulárny G4 s paralelnými reťazcami, (B) tetramolekulárny s antiparalelnými reťazcami, (C) bimolekulárne G4, (D) unimolekulárne G4 [120].

2.5 Metódy sledovania väzby proteínov k DNA

2.5.1 Gélová retardačná analýza

EMSA (z angl.: „The electrophoretic mobility shift assay“) je gélová retardačná analýza, ktorá sa využíva k sledovaniu interakcií medzi nukleovými kyselinami a proteínmi [121]. Metóda je založená na porovnávaní elektroforetickej mobility komplexu proteín-nukleová kyselina s mobilitou voľnej nukleovej kyseliny, ktorá je ako referenčná vzorka rýchlejšia [122].

Medzi výhody jednoznačne patrí jednoduchosť a optimalizovateľnosť, vďaka širokej škále väzbových podmienok, ktoré umožňujú modifikácie metódy vzhľadom na konkrétne vzorky. Použitím rádioizotopového značenia nukleovej kyseliny je možné dosiahnuť vysokú citlivosť, ktorá sa využíva pri koncentráciách nižších než 0,1 nM, alebo objemoch menších než 20 μ l. Pri nižších nárokoch na citlivosť sa využíva fluorescenčná, chemiluminiscenčná alebo imunohistochemická detekcia. Správne zvolené podmienky merania môžu poskytnúť aj kvantitatívne informácie k určeniu väzbovej stechiometrie, afinity a kinetiky [122].

Aj napriek veľkej popularite má EMSA aj určité obmedzenia. Najviac limitácii tejto metódy je spojených s chemickou rovnováhou behom elektroforetických krokov. Dôležité je navoliť správnu rýchlosť disociácie. Rýchla disociácia zabraňuje detekcii komplexov, zatiaľ čo pomalá disociácia môže viesť k zníženiu väzbovej hustoty. Ďalším obmedzením je fakt, že elektroforetickú mobilitu ovplyvňujú okrem veľkosti sledovaných častíc aj iné faktory, ako napr. priestorový tvar častíc. Z toho dôvodu sa EMSA kombinuje s „western blotting-om“ alebo hmotnostným spektrometrom [122].

2.5.2 Mikroskopia atomárných síl

V osemdesiatych rokoch minulého storočia prispelo zostrojenie mikroskopu atomárných síl k lepšiemu porozumeniu fyzikálnych vlastností materiálov na úrovni atómov [123]. Metóda AFM (z angl.: „Atomic force microscope“) bola prvýkrát použitá na sledovanie proteín-DNA komplexu (*E.coli* RNA polymerázy s DNA) v roku 1992 [124]. AFM od prvého použitia preukázala svoje obrovské výhody pri sledovaní biologických vzoriek a najmä pri sledovaní interakcií proteínov s nukleovými kyselinami. Výhodou AFM zobrazovania je relatívna jednoduchosť a neinvazívnosť procesu, čo umožňuje zobrazovanie pri fyziologických podmienkach. Pomerne dlhé DNA substráty môžu byť použité bez potreby značenia, odfarbovania alebo fixácie, či už DNA alebo proteínu [125].

Pomocou AFM je možné sledovať deje na úrovni jednej molekuly, ktoré vo väčšine prípadov nie je možné inak sledovať [125].

AFM poskytuje topografické dáta vzoriek. Doposiaľ vyvinutý AFM mikroskop je schopný pracovať v troch módoch: kontaktnom, nekontaktnom a oscilačnom. Oscilačný mód je pre potreby biologických štúdií a interakcií proteínov s DNA využívaný najčastejšie, kvôli najmenšiemu rozrušovaniu vzoriek v substráte. Hrot oscilačnej sondy skenuje vzorku a umožňuje 3D zobrazenie [126].

Pomocou AFM mikroskopie je možné získať informácie o väzbovej pozícii pri interakcii proteínu s DNA, kedy sa meria dĺžka obrysu molekuly DNA od jedného konca k stredu viazaného proteínu. Väzbová pozícia môže byť meraná v pixeloch a následne vyjadrená pomocou percent z celkovej dĺžky obrysu DNA alebo konvertovaná na páry báz z celkového rozlíšenia. Dostupné informácie z experimentu obsahujú jednotlivé väzbové pozície, a preto je ich možné vyhodnotiť pomocou histogramu, resp. Gaussovej krivky [125].

AFM mikroskopia nachádza uplatnenie aj pri určení stechiometrického pomeru interakcie proteínu s DNA [127] a zmien štruktúry DNA vplyvom interakcie s proteínmi [125].

3 PRAKTICKÁ ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Použité plazmidy

3.1.1.1 Plazmidy použité na väzbové experimenty

pBluescript SK II (-)

pPGM2

Derivát pBluescript SKII s vloženou sekvenciou v HindIII AGACATGCCTAGGCAT GTCT o veľkosti 20 bp. Inzert obsahuje cieľovú sekvenciou pre p53.

pCFNO

Derivát pBluescript SKII s vloženou sekvenciou v HindIII CATGATGTGATCACATC ATG o veľkosti 20 bp. Inzert vytvára krížové štruktúry.

pB-6GC

Derivát pBluescript SKII s vloženou sekvenciou v HindIII TGGGGGGCGGGGGGCGGG GGGCGGGGGGT o veľkosti 19 bp. Inzert je schopný vytvárať G4 kvadrupelex.

p-B3Myc

Derivát pBluescript SKII, ktorému bolo do HindIII vložená trikrát sekvencia TTCCCCACCCTCCCCACCCTCA o veľkosti 22 bp. Sekvencia je schopná vytvárať G4 kvadrupelex.

3.1.1.2 Plazmidy použité na transaktivačnú analýzu

pRS-314

Plazmid obsahuje promótor pre syntézu tryptofánu (TRP) v sekvencii.

pRS-315

Plazmid obsahuje promótor pre syntézu leucínu (LEU) v sekvencii.

pLS-WT

Plazmid obsahuje inducibilný GAL promótor v sekvencii. Plazmid obsahuje selekčné markery na LEU a TRP.

pTSG-R175H

Plazmid obsahuje konštitutívny ADH promótor v sekvencii. Plazmid obsahuje selekčné markery na LEU a TRP.

pTSG-R273H

Plazmid obsahuje konštitutívny ADH promótor v sekvencii. Plazmid obsahuje selekčné markery na LEU a TRP.

pLS-R273H

Plazmid obsahuje inducibilný GAL promótor v sekvencii. Plazmid obsahuje selekčné markery na LEU a TRP.

3.1.2 Použité bunky

E. coli BL21 (Thermofischer scientific)

E. coli TOP10 (Thermofischer scientific)

Kmene *Sacharomyces cereviseae*: PUMA, PUMA-KSHV (CIBIO, Trento, Italy)

Tabuľka 1: Zoznam sekvencií rezpozívnych elementov

Názov	Sekvencia 5' – 3'
PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC
PUMA-KSHV	CTGCAAGTCCTGACTTGTCCGGGGCGGGGGACGGGGGAGGGGG

3.1.3 Chemikálie

Adenín (Sigma-Aldrich)
 Agar (Oxoid)
 Akrylamid:bisakrylamid 19:1 (Serva)
 Bradfordové činidlo (Serva)
 Bromfenolová modrá (Lachema)
 Butanol (Penta)
 Dihydrogénfosforečnan draselný (Serva)
 Ditiotreitol (Thermofischer scientific)
 DMSO (Sigma-Aldrich)
 Etídium bromid (Bio-rad)
 Galaktóza (Alfa Aesar)
 Glukóza (Sigma-Aldrich)
 Glycerol (Serva)
 Glycín (Serva)
 Histidín (Sigma-Aldrich)
 Hovädzi sérový albumín (Sigma-Aldrich)
 Hydrogénfosforečnan disodný (Acros organics)
 Hydroxid sodný (Serva)
 Chlomgrid sodný (Penta)
 Chlorid draselný (Sigma-Aldrich)
 Chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich)
 Chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich)
 Chlorid zinočnatý (Sigma-Aldrich)
 Imidazol (Serva)
 IPTG (Sigma-Aldrich)
 Izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranozid
 Izopropylalkohol (Penta)
 Kvasinkový extrakt (Duchefa Biochemie)
 Kyselina boritá (Penta)
 Kyselina etyléndiamínotetraoctová (Sigma-Aldrich)
 Kyselina octová (Lach-ner)
 Lyzín (Sigma-Aldrich)
 MES hydrát (Sigma-Aldrich)
 Metanol (Sigma-Aldrich)
 Octan lítny (VWR Chemicals)
 Peroxodisíran amónny (Sigma-Aldrich)
 Polyetylén glykol (Merck)

Rafinóza pentahydrát (VWR Chemicals)
SDS (Sigma-Aldrich)
Síran amonný (Duchefa Biochemie)
Síran horečnatý (VWR Chemicals)
Síran zinočnatý (Penta)
Tetrametyletyléndiamín (Sigma-Aldrich)
Tris hydrochlorid (Sigma-Aldrich)
Tris ultrafiltrát (Duchefa Biochemie)
Triton X-100 (Roth)
Trypton (Duchefa Biochemie)
Uracil (Sigma-Aldrich)
YNB (Sigma-Aldrich)
YPD (Sigma-Aldrich)
 β -Merkaptoetanol (Serva)

3.1.4 Ostatné materiály

1 kb DNA ladder (Bio-labs)
5x Passive lysis buffer (Promega)
AFM hroty scanasyst-air-hr (bruker)
AFM mica (bruker)
Ampicilín (Biotika)
Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega)
DO-1 (Santa Cruz Biotechnology)
E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit (Omega Bio-tek)
Filtročná membrána 0,22 μ m (VWR Chemicals)
GelRed (Biotium)
Chloramfenikol (Sigma-Aldrich)
Kozia anti-myšacia peroxidáza (Sigma-Aldrich)
Nanašací pufer bez SDS, 6x (Bio-labs)
Nitrocelulóзовá membrána (Pall Corporation)
Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-rad)
Proteinázový inhibitor cOmplete, EDTA-free (Roche)
Salmon sperm (Thermofischer scientific)
Supersignal West Pico + (Thermofischer)
Sušené mlieko (Laktino)
Talon metal affinity resin (Takara)

3.1.5 Laboratórne prístroje

Amersham Imager 680 (GE Healthcare Bio-Sciences AB)
Autokláv Microjet personal microwave (Enbio)
Centrifúga 5804 R (Eppendorf)
Centrifúga Avanti J-30 I (Beckman)
Centrifúga Mini Spin plus (Eppendorf)
Elektroforetická aparátúra Mini Protean Tetra Cell System (Bio-Rad)

Elektroforetická aparátúra Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
 ELISA reader Synergy H1 Hybrid Multi-mode Reader (BioTek)
 Homogenizátor Pellet mixer (VWR)
 Inkubátor Innova 44 (New Brunswick Scientific)
 Magnetická miešačka MSH-30A (WiseStir)
 Multimode VIII SPM (Veeco)
 Nakláňadlo (Biosan)
 pH meter Orion 3 Star (Thermo scientific)
 Sonifikátor (Dynatech)
 Spektrofotomerer Specord 210+ (Analytikjena)
 Spektrofotometer DS-11 FX+ (Denovix)
 Termoblok Thermomixer comfort 1,5 ml (Eppendorf)
 Transluminátor UVT-28 MP (Herolab)
 Trepáčka KS 130 Basic (IKA)
 Váha stolná 440-47N (Kern)
 Váha stolná TE 412 (Sartorius)
 Vortex 4 digital (IKA)
 Zdroj napätia PowerPac 1000 (Bio-Rad)
 Zdroj napätia PowerPac Basic (Bio-Rad)

3.1.6 Príprava médií a roztokov

Adenín, 0,5 % 200 ml	0,5 % adenín; doplnené 0,1 M NaOH.
AFM pufer, 20 ml	10 mM MgCl ₂ , 5 mM KCl, 20 mM MES; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Akrylamid, 5 %, 100 ml	12,5 ml 40% akrylamid:bisakrylamid 19:1, 12,5 ml 1 M Tris (pH = 6,8), 0,5 ml 20% SDS; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Akrylamid, 10 %, 300 ml	75 ml 40% akrylamid:bisakrylamid 19:1, 112 ml 1 M Tris (pH = 8,8), 1,5 ml 20% SDS; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Blokovací roztok, 200 ml	5 % odtučnené mlieko; doplnené 1x PBS.
Blotovací pufer, 10x, 1 000 ml	30,3 g Tris, 145 g glycín; doplnené Milli-Q H ₂ O. Pracovný roztok 1x pripravený z 1 dielu 10x zásobného roztoku, 1 diel metanol, 8 dielov Milli-Q H ₂ O.
CSB, 5x 2 ml	0,25 M Tris, 8 % SDS, 40 % glycerol, 8 % β-Merkaptoetanol, 0,4 % bromfenolová modrá.
DTT, 1 M 10 ml	1,5 g DTT; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Elučný pufer, 1 000 ml	500 mM imidiazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-Merkaptoetanol, 5 % glycerol; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Galaktóza, 20 % 50 ml	10 g galaktóza; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Histidín, 1 % 15 ml	0,15 g histidín; doplnené Milli-Q H ₂ O.
IPTG, 1 M 10 ml	2,38 g IPTG; doplnené Milli-Q H ₂ O.
LB médium	1 % NaCl, 1 % trypton, 0,5% kvasinkový extrakt.
LB miský	1 % NaCl, 1 % trypton, 0,5% kvasinkový extrakt; 1,4% agar.

TE-LiAC, 1x	10 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 1 mM EDTA, 0,1 M octan lítny; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Lyzačný pufer, 1 000 ml, pH = 8,0	5 mM imidiazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-Merkaptoetanol, 0,1 % Triton X-100, 5 % glycerol; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Lyzín, 3 % 15 ml	0,45 g Lyzín; doplnené Milli-Q H ₂ O.
PBS, 10x 1 000 ml	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ ; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Premývací pufer, 1 000 ml, pH = 8,0	10 mM imidiazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-Merkaptoetanol, 5 % glycerol; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Running pufer, 10x 1 000 ml	30,3 g Tris, 144,2 g glycín, 10 g SDS; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Selektívne tAisky, 400 ml	2,68 g YNB, 2 % agar, 2 % dextróza, 4 % adenín, 1 % histidín, 3 % lyzín, 1 % uracil, 0,26 % peroxidisíran amónny; doplnené Milli-Q H ₂ O.
Selektívne SRtA tekuté médium s rafinózou, 500 ml	3,35 g YNB, 2 % rafinóza, 0,5 % adenín, 1 % histidín, 3 % lyzín, 1 % uracil; doplnené Milli-Q H ₂ O.
SOC médium, 100 ml	2 g trypton, 0,5 g kvasinkový extrakt, 1 ml 1 M NaCl, 25 ml 1 M KCl, 2 ml 1 M glukóza, 1 ml 1 M MgCl ₂ , 1 ml 1 M MgSO ₄ ; doplnené Milli-Q H ₂ O.
TAE pufer, 50x 1 000 ml	242 g Tris, 18,6 g EDTA, 57,1 ml kyselina octová; doplnené Milli-Q H ₂ O.
TBE pufer, 10x 1 000 ml	108 g Tris, 55 g kyselina boritá, 40 ml 0,5M EDTA (pH= 8,0); doplnené Milli-Q H ₂ O.
Uracil, 1 % 15 ml	0,15 g uracil; doplnené 0,1 M NaOH.
Väzbový pufer (EMSA), 20x 1 ml	1 M KCl, 100 mM Tris (pH = 7,6); 10 mM EDTA (pH = 8,0), 0,2 % Triton X-100.
Väzbový pufer, 1 000 ml, pH = 8,0	5 mM imidiazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-Merkaptoetanol, 5 % glycerol; doplnené Milli-Q H ₂ O.
YPDA médium, 200 ml	10 g YPD, 0,5 % adenín; doplnené Milli-Q H ₂ O.
YPDAisky, 200 ml	4 g YPD, 2 % agar, 0,5 % adenín; doplnené Milli-Q H ₂ O.

3.2 Izolácia plazmidovej DNA

Do 5 ml LB média s prídavkom ampicilínu (pridávané v pomere 1:1 000) boli pridané bunky (*E.coli* TOP10) s obsahom cieľovej plazmidovej DNA. Bunky boli inkubované v 15 ml skúmavkách cez noc pri 37 °C a 110 rpm. Ráno bola kultúra postupne centrifugovaná za podmienok 60 sekúnd pri 10 000 x g. K izolácii plazmidovej DNA z vytvoreného peletu bol použitý alkalicko-lyzačný kit (Omega). K peletu bolo pridaných 250 μl roztoku 1. Po precíznom resuspendovaní bol obsah skúmavky premiestnený do novej 1,5 ml skúmavky, do ktorej bolo taktiež pridaných 250 μl roztoku 2. Zmes bola premiešaná jemným rotovaním do vytvorenia čistého lyzátu a inkubovaná 2 minúty. Následne bolo pridaných 350 μl roztoku 3. Skúmavky boli päťkrát prevrátené do vytvorenia bielej vločkovitej zrazeniny. Skúmavky

boli umiestnené do centrifúgy a centrifugované 10 minút pri 13 000 x g. Do 2 ml zberných skúmaviek boli umiestnené DNA väzbové kolóny. Supernatant po centrifugácii bol premiestnený na DNA väzbové kolóny a centrifugovaný na maximálnych otáčkach 1 minútu. Po odstránení filtrátu bolo na kolóny pridaných po 500 µl HBC pufru s prídavkom 100% izopropanolu a vzorky boli centrifugované za rovnakých podmienok. Filtrát bol zo zberných skúmaviek odstránený. Po pridaní 700 µl DNA premývacieho pufru s prídavkom 100% etanolu boli vzorky centrifugované 30 sekúnd na maximálnych otáčkach. Filtrát bol odstránený a nasledujúcou 2 minútovou centrifugáciou pri maximálnych otáčkach bola DNA naviazaná na kolónu zbavenú prebytočného etanolu. DNA väzbové kolóny boli vložené do nových 1,5 ml skúmaviek a na kolóny bolo pridaných 50 µl elučného pufru. Po 1 minútovej inkubácii s elučným pufrom boli vzorky 1 minútu centrifugované na maximálnych otáčkach pričom výsledkom bol supernatant obsahujúci cieľovú DNA.

3.3 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentrácia plazmidovej DNA bola stanovovaná pomocou spektrofotometru „Nanodrop“ (Denovix), na ktorý bolo nanášaných 1,5 µl plazmidovej DNA oproti blanku (elučný pufer). Izolovaná DNA bola následne analyzovaná za použitia gélovej elektroforézy. Bol pripravený 1% agarózový gél v 1x TAE pufrí, ku ktorému bol pridaný 1 µl farbiva GelRed pred vytuhnutím gélu. Vzorky boli upravené na množstvo DNA odpovedajúce 100 ng v konečnom objeme 10 µl, ku ktorým boli následne pridané 2 µl 6x koncentrovaného nanášacieho pufru. Spolu so vzorkami bol na gél aplikovaný požadovaný rebríček o veľkosti 1 kb. Elektroforéza prebiehala v prostredí 1x TAE pufru po dobu 45 minút pri konštantnom napätí 110 V. Po skončení elektroforézy bol gél vyhodnotený za použitia transluminátoru.

3.4 Príprava a izolácia proteínov

3.4.1 Bakteriálna transformácia

Vopred pripravené kompetentné bunky BL21 boli rozdelené po 50 µl do pripravených 1,5 ml skúmaviek. K bunkám bolo pridaných 50 ng plazmidov obsahujúcich vložené sekvencie génov pre wtp53, p53^{R273H} a p53^{R175H}. Zároveň bola pripravovaná negatívna kontrola, ktorá okrem kompetentných buniek BL21 neobsahovala prídavok plazmidovej DNA. Takto pripravené suspenzie boli inkubované 30 minút na ľade. Vzorky boli následne umiestnené na 45 sekúnd do termobloku vyhriateho na 42 °C k prevedeniu teplotného šoku a potom prenesené na 2 minúty na ľad. K bunkám bolo pridaných 250 µl predhriateho SOC média, s ktorým boli inkubované 1 hodinu pri 37 °C a 250 rpm. 100 µl zmesi bolo rozotretých na LB miske s prídavkom AMP a CAM (v pomere 1 : 1 000). AMP je antibiotikum, ktoré zabraňuje baktériám vytvárať bunkovú stenu, a taktiež je to selekčný marker pre plazmid. CAM inhibuje proteosyntézu a používa sa ako selekčný marker pre bunky BL21. Použitím týchto antibiotík je docielená selektivita transformantov, pretože spolu s génmi pre expresiu proteínov plazmidy obsahujú aj gény rezistencie proti antibiotikám. Následne boli misky inkubované do druhého dňa pri 37 °C. Na druhý deň bola z misiek odobraná jedna kolónia, ktorá bola použitá k príprave krížového rozteru. Krížové roztery boli inkubované pri 37 °C do druhého dňa.

3.4.2 Izolácia proteínov

Do 25 ml LB média s AMP a CAM boli pridané bunky (BL21) s obsahom plazmidu k expresii požadovaného proteínu. Takto pripravená suspenzia bola kultivovaná cez noc za podmienok: 37 °C, 110 rpm. Na druhý deň bola štartovacia kultúra pridaná k 1 l média (s AMP a CAM) v 5 litrovej Erlenmayerovej banke. Kultúra bola následne inkubovaná pri 37 °C a 110 rpm do dosiahnutia potrebnej optickej hustoty ($OD_{600} = 0,7 - 1,0$; na UV/VIS spektrofotometri oproti referenčnej vzorke („blank“), ktorá obsahovala čisté médium). Po dosiahnutí požadovanej hodnoty OD_{600} bola inkubácia ukončená a z média bol odobraný 1 ml ako kontrola pred indukciou. K médiu bolo pridaných 100 μ l $ZnCl_2$ a 1 ml 1 M IPTG. Kultúra bola umiestnená do vytemperovaného inkubátoru na 16 °C a ponechaná k inkubácii cez noc pri 110 rpm. Na druhý deň bol z kultúry odobratý 1 ml slúžiaci ako kontrola po indukcii. Kultúra bola postupne centrifugovaná v Beckmanových kyvetách 20 minút pri 6 500 x g a teplote 4 °C. Pelet po centrifugácii bol resuspendovaný v 40 ml lyzačného pufru s obsahom proteínových inhibítorov a následne inkubovaný 30 minút na ľade. Lyzát po inkubácii bol desaťkrát sonifikovaný po dobu 30 sekúnd pri 4 °C. Medzi jednotlivými opakovaniami sonifikácie bol lyzát inkubovaný na ľade 30 sekúnd. Následne bol lyzát centrifugovaný 30 minút pri 14 000 x g a 4 °C. Po centrifugácii bolo odobratých 200 μ l slúžiacich ako kontrola 3 po sonifikácii. K supernatantu boli pridané aktivované histidín-afinitné guľičky „Talon metal affinity resin“. K aktivácii 4 ml afinitných guľičiek bolo použitých 40 ml väzbového pufru, pričom po aktivácii bola suspenzia centrifugovaná 5 min pri 2 000 x g a 4 °C. Väzbový pufer po centrifugácii bol opatrne odliaty a ku guľičkám bol pridaný supernatant po lýze. Vzorky boli nakláňané 1 hodinu pri 4 °C. Vzorky po nakláňaní boli centrifugované 5 min pri 2 000 x g a 4 °C a zo vzoriek bola odobratá kontrola 4 (200 μ l). Prebytočný supernatant bol opatrne odobraný s následným pridaním 40 ml väzbového pufru a roztok bol centrifugovaný 5 min pri 2 000 x g, 4 °C. Následne bolo odobraných 200 μ l ako kontrola 5 a supernatant bol odstránený. Po pridaní 40 ml premývacieho pufru ku guľičkám boli vzorky centrifugované 5 min pri 2 000 x g a 4 °C. Bolo odobratých 200 μ l ako kontrola 6. Zo vzoriek bol čiastočne zliaty supernatant a zvyšok bol kvantitatívne prenesený do afinitnej kolóny. Po odtečení zvyšku premývacieho pufru bol na kolónu dávkovaný 1 ml elučného pufru päťkrát. Každý z piatich prídavkov elučného pufru bol zbieraný do 1,5 ml skúmavky umiestnenej pod kolónou. Všetky elučné frakcie boli pomocou tekutého dusíka zmrazené a uskladnené v hlbokozmrazovacom boxe (-80 °C).

3.4.3 Stanovenie koncentrácie proteínov

Koncentrácia izolovaných proteínových elúcií bola stanovená pomocou Bradfordovej metódy. Do 1,5 ml skúmaviek bolo pridaných 396 μ l Milli-Q H_2O , 100 μ l činidla Bradfordovej a 4 μ l stanovovaných proteínov. Okrem stanovovaných proteínov bola pripravená kalibračná rada z hovädzieho sérového albumínu (BSA). Analýza prebiehala v 96 jamkovej doštičke, na ktorú bolo nanášaných po 200 μ l zmesi v dvoch opakovaníach. Koncentrácia bola stanovená po 10 minútach na čítačke ELISA reader Synergy H1 Hybrid Multi-mode Reader (BioTek) pri $\lambda = 595$ nm.

3.4.4 Detekcia proteínov

Izolované proteíny boli detegované za použitia denaturačnej gélovej elektroforézy v polyakrylamidovom géli s obsahom dodecylsulfátu sodného (PAGE-SDS). Použitý gél bol pripravený z dvoch vrstiev: spodná (separačná) vrstva a vrchná (koncentračná) vrstva. Na prípravu separačnej vrstvy bolo použitých 10 ml 10% akrylamidu, 15 μ l TEMEDu, 45 μ l APS. Po premiešaní zložiek separačnej vrstvy bola zmes vliata do aparatury a okamžite prevrstvená butanolom. Po zatuhnutí spodnej vrstvy bol butanol z aparatury odstránený pomocou filtračného papiera a spodná vrstva bola zaliate koncentračnou vrstvou do ktorej bol umiestnený hrebienok. Koncentračná vrstva bola zložená z 3 ml 5% akrylamidu, 7 μ l TEMEDu, 30 μ l APS.

Kontroly pred a po indukcii boli centrifugované 2 minúty pri 6 000 x g a laboratórnej teplote. Supernatant bol odstránený a pelet resuspendovaný v 80 μ l Milli-Q H₂O. Ku vzorkám bolo pridaných 20 μ l 5x CSB. K 30 μ l jednotlivých kontrol, ktoré boli odoberané počas izolácie proteínov, bolo pridaných 7,5 μ l 5x CSB. K 9 μ l elučných frakcií bolo pridaných 2,25 μ l 5x CSB. Takto pripravené vzorky boli denaturované 5 minút pri teplote 95 °C. Pred nanosením na polyakrylamidový gél boli vzorky vortexované a centrifugované. Gély boli vložené do aparatury a zaliate 1x elektroforetickým „running“ pufrom. Po zaliatí boli z gélu odstránené hrebienky a do jamienk gélu bolo nanosených 10 μ l kontrol a 3 μ l elučných frakcií. Na gél bol pridaný okrem vzoriek aj proteínový rebríček s veľkosťou 10 – 250 kDa v objeme 3 μ l a 1,5 μ l. Elektroforéza pozostávala z troch fáz: 15 minút pri 50 V, 15 minút pri 100 V a 60 minút pri 150 V.

Gél bol vyhodnocovaný imunodetekčne. V nádobe s obsahom 1x blotovacieho pufru bol zložený blotovací „sandwich“, ktorý sa skladal z formy, molitanovej podložky, 2 kusov filtračného papiera, polyakrylamidového gélu, nitrocelulózy (NC) blotovacej membrány, 2 kusov filtračného papiera a molitanovej podložky. Pripravená forma bola spolu s chladiacim článkom vložená do blotovacej aparatury. Vaňa bola zaliate 1x blotovacím pufrom a blotovací prenos prebiehal 90 minút pri konštantnom prúde 150 mA. Po dokončení prenosu bola membrána prenesená do vaničky s blokovacím roztokom (5 % odtučnené mlieko rozpustené v 1x PBS pufri). Po 20 minútach bolo mlieko z nádoby odstránené a k membráne bola pridaná primárna protilátka (monoklonálna myšacia DO-1) v 5% mlieku zmiešaná v pomere 1 : 1 000. Membrána s pridanou primárnou protilátkou bola inkubovaná na trepačke pri 4 °C cez noc. Na druhý deň bola protilátka z nádoby odstránená a membrána bola premývaná 1x PBS pufrom päťkrát, vždy po 5 minút. Následne bola k membráne pridaná sekundárna protilátka (kozia anti-myšacia peroxidáza) v 5% mlieku v pomere 1 : 10 000 a pri laboratórnej teplote bola membrána inkubovaná 60 minút na trepačke. Zvyšky nenaviazanej sekundárnej protilátky boli odstránené premývaním 1x PBS pufrom. Premývanie bolo opakované päťkrát po dobu 5 minút. Na NC membránu bolo pred analýzou pridaný 1 ml chemi-luminiscenčného substrátu Supersignal West Pico (ThermoFischer). Signál bol analyzovaný pomocou chemi-luminiscenčného módu prístroja Amersham Imager 680 (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

3.5 EMSA

Väzbové vlastnosti wtp53 a mutp53 proteínov boli skúmané metódou gélovej retardačnej analýzy, ktorá prebiehala v prostredí 1% agarózového gélu, ktorý bol pripravený z 0,5x TBE

pufra. V závislosti na koncentrácii izolovaných proteínov a DNA štruktúr bolo vypočítané potrebné množstvo vzoriek. Do 1 ml skúmaviek bolo pridaných 300 ng DNA, 20x väzbový pufer do výslednej koncentrácie 1x a 1 M DTT do výslednej koncentrácie 1 mM. Počas celej prípravy boli skúmavky uchovávané na ľade. Do skúmaviek bola pridaná Milli-Q H₂O v závislosti od koncentrácie vzoriek, tak aby výsledný objem činil 30 µl. Po krátkej inkubácii na ľade bol ku vzorkám pridaný odpovedajúci proteín v pomeroch molárnych koncentrácií 1 : 1, 2 : 1, 4 : 1, 8 : 1, 16 : 1 (proteínový tetramér : DNA). Po 10 minútovej inkubácii na ľade bol ku vzorkám pridaný 3x koncentrovaný nanášací pufer, s výslednou koncentráciou 1x. Vzorky v skúmavkách boli dobre premiešané a nanesené do štartov v agarózovom géli, ktorý bol zaliaty 0,5x TBE pufrom. Elektroforéza prebiehala pri teplote 4 °C, konštantnom napätí 90 V po dobu 180 minút. Po dokončení elektroforézy bol gél vybratý z elektroforetickej nádoby a umiestnený do 1% roztoku etídium bromidu a ponechaný k farbeniu po dobu 15 minút. Po farbení bol gél ponorený do destilovanej vody a ponechaný k odfarbeniu 10 minút. Snímka gélu bola vyhotovená pri vlnovej dĺžke 312 nm pomocou prístroja Amersham Imager 680 (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

3.6 AFM

Vzorky elúcie proteínov boli zmiešané s 200 ng plazmidov v pomere molárnej koncentrácie 2:1. K zmesi bol pridaný 1x väzbový pufer. Ku vzorkám bola pridaná Milli-Q H₂O do výsledného objemu 20 µl. Vzorky boli inkubované 30 minút na ľade a následne bolo ku vzorkám pridaných po 80 µl AFM pufru. 10 µl zmesi bolo nanesených na AFM terčik a ponechaných k zaschnutiu 2 minúty. Následne bol terčik premytý 1 ml Milli-Q H₂O. Prebytočná voda bola z terčika odstránená pomocou stlačeného vzduchu. Po 10 minútovej inkubácii boli vzorky merané pomocou prístroja Multimode VIII SPM (Veeco). Namerané dáta boli vyhodnotené pomocou GPL softvéru Gwyddion.

3.7 Transformácia kvasiniek

Transaktivačná aktivita proteínov bola sledovaná v dvoch kvasinkových kmeňoch – PUMA a PUMA-KSHV. Kvasinkový kmeň PUMA obsahuje cieľovú sekvenciu pre p53 – RE. Kmeň PUMA-KSHV obsahuje okrem responzívneho elementu aj kvadruplexovú štruktúru G4 lokalizovanú za RE.

Jedna kolónia vybraného kmeňa bola cez noc inkubovaná v 10 ml YPDA média pri 30 °C. Na druhý deň bolo médium rozdelené po 1 ml do 1,5 ml skúmaviek. Skúmavky boli krátko centrifugované do vytvorenia bunkového peletu. Supernatant po centrifugácii bol odstránený a pelet bol premytý 1 ml Milli-Q H₂O a opäť krátko centrifugovaný. Po odstránení supernatantu boli k peletu pridané plazmidy (podľa kombinácií uvedených v tabuľke 2) v množstve 300 ng a 5 µl nosičovej DNA vopred predhriatej na 100 °C po dobu 5 minút. Ku vzorkám bolo následne pridaných 300 µl zmesi PEG-LiAC-TE a 35 µl DMSO. Obsah skúmaviek bol opatrne premiešaný. Vzorky boli následne inkubované 30 minút pri 30 °C a 260 rpm v naklonenej rovine. Skúmavky po inkubácii boli premiestnené do termobloku nastaveného na 42 °C a podrobené teplotnému šoku po dobu 15 minút. Vzorky boli centrifugované 3 minúty pri 3 000 x g a 25° C, po ktorej bol PEG zo skúmaviek odstránený. Pelet bol resuspendovaný

v 100 μ l Milli-Q H₂O a 50 μ l transformačnej zmesi bolo rozotretých na selektívnych leucín a tryptofánových (ItA) miskách. Misky boli inkubované tri dni pri teplote 30 °C.

Tabuľka 2: Kombinácie použitých plazmidov.

Poradie	Plazmid 1	Plazmid 2
	Názov	Názov
1.	pRS-314	pRS-315
2.	pLS-WT	pRS-314
3.	pTSG-R273H	pRS-315
4.	pTSG-R273H	pLS-WT
5.	pTSG-R175H	pRS-315
6.	pTSG-R175H	pLS-WT
7.	pTSG-R175H	pLS-R273H

Plazmidy pRS314 a pRS315 obsahujú promótory pre syntézu AMK – TRP (pRS314) a leucínu – LEU (pRS315). Plazmidy s označením pTSG obsahujú konštitutívne promótory GPD, ktoré zabezpečujú nepretržitú expresiu v živých bunkách pri selekcii na TRP. Nepretržitá expresia v kvasinkovom systéme nie je závislá na koncentrácii galaktózy v médiu. Taktiež boli používané plazmidy s označením pLS, ktoré obsahujú indukibilne promótory závislé od prítomnosti galaktózy v LEU selektívnom médiu.

3.8 Analýza transaktivačného potenciálu

Transformanty boli rozotreté do obdĺžnikov s veľkosťou 1 x 0,5 cm na nové ItA misky. Z každého transformantu bolo vyhotovených 6 obdĺžnikov, kvôli štatistickému vyhodnoteniu transaktivačnej aktivity. Misky boli inkubované dva dni pri 30 °C.

Pred samotnou analýzou bola najprv pripravená základná doštička. Do jamiek 96 jamkovej doštičky bolo napipetovaných po 200 μ l SRItA média. Sterilným špáradlom bola odobratá časť pripraveného obdĺžnika a resuspendovaná v jednotlivých jamkách. Z každého transformantu bolo pripravených 5 opakovaní. Následne boli pripravené 3 nové 96 jamkové doštičky, do ktorých bolo pridaných 60 μ l SRItA suspenzie zo základnej 96 jamkovej doštičky. K bunkovým suspenziám bolo pridaných 60 μ l SRItA média s rozdielnou koncentraciou galaktózy (0 %, 0,05 %, 0,5 %). Takto pripravené doštičky boli parafilmované a inkubované pri 30 °C a 160 rpm 24 hodín.

Sledovanie transaktivačnej aktivity prebiehalo v čase 0, 6 a 24 hodín od prípravy 96 jamkových doštičiek. Obsah každej jamky bol dôkladne premiešaný a bola stanovená optická hustota OD₆₀₀. Z 96 jamkovej doštičky bolo odobratých 20 μ l suspenzie, ktorá bola premiestnená do bielej 384 jamkovej doštičky. K 20 μ l suspenzie bolo pridaných 20 μ l 2x koncentrovaného lyzačného pufru a doštička bola inkubovaná 15 minút na trepačke. Pred analýzou bolo k zmesi pridaných 20 μ l luciferázového substrátu Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega). Luminiscencia bola zaznamenávaná pomocou prístroja „Synergy H1 hybrid reader (BioTek). Namerané dáta boli štatisticky vyhodnotené.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

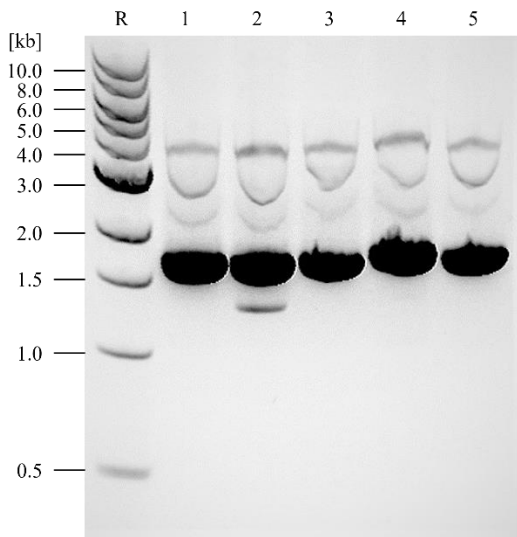
4.1 Stanovenie koncentrácie a čistoty plazmidovej DNA

Plazmidová DNA bola z buniek izolovaná pomocou komerčnej súpravy spoločnosti Omega (kapitola 3.2). Koncentrácia a čistota izolovanej plazmidovej DNA bola overená na UV-VIS spektrofotometri Nanodrop. Čistota plazmidovej DNA bola určená z pomeru 260/280, pretože absorpčné minimum čistej DNA je 260 nm a absorpčné minimum bielkovín je 280 nm. Hodnota pomeru absorbancie 260/280 pre čistú DNA leží v rozmedzí 1,8 – 2,0. Podľa hodnôt čistoty uvedených v tabuľke 3 je možné usudzovať, že bola získaná plazmidová DNA bez známkov kontaminácie bielkovinami alebo RNA.

Tabuľka 3: Namerané hodnoty koncentrácie a čistoty izolovanej plazmidovej DNA.

Plazmidová DNA	Koncentrácia [$\mu\text{g/ml}$]	Čistota 260/280 [-]
pBluescript SK II	293,008	1,852
pPGM2	234,472	1,873
pCFNO	376,608	1,807
pB-6GC	277,033	1,949
p-B3Myc	167,056	1,866

Izolovaná DNA bola taktiež analyzovaná agarózovou gélovou elektroforézou (obrázok 8). Okrem vzoriek plazmidovej DNA bol na gél aplikovaný 10 kb DNA rebríček (New England Biolabs). Veľkosť všetkých vzoriek izolovanej DNA odpovedala veľkostiam cieľových plazmidov.



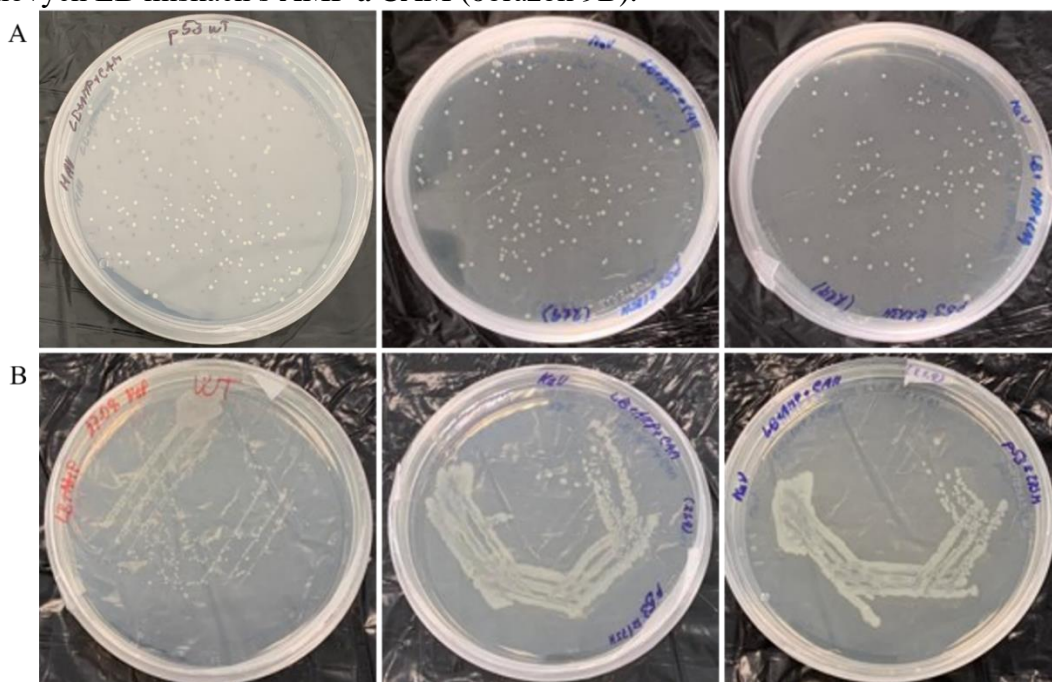
Obrázok 8: Agarózová gélová elektroforéza plazmidovej DNA; R – DNA rebríček o veľkosti 500 bp až 10 kb, 1. pPGM2, 2. pBluescript SK II, 3. pCFNO, 4. p-B3Myc, 5. pB-6GC.

4.2 Príprava a izolácia proteínov

4.2.1 Bakteriálna transformácia

S cieľom expresie požadovaných proteínov boli bunky BL21 transformované podľa kapitoly 273.4.1. Transformované bunky boli kultivované na agarových LB miskách s obsahom AMP a CAM (obrázok 9A). Za účelom zisku jednotlivých kolónií bola odobratá

jedna kolónia z narastených misiek a následne metódou krížového rozteru kultivovaná na nových LB miskách s AMP a CAM (obrázok 9B).



Obrázok 9: Výsledok transformácie; (A) kolónie po transformácii plazmidovej DNA, (B) krížový rozter.

4.2.2 Stanovenie koncentrácie proteínov

Koncentrácia izolovaných proteínov bola stanovená pomocou Bradfordovej metódy. Tabuľka 4 obsahuje jednotlivé namerané koncentrácie izolovaných proteínov. V frakcii č. 1 proteínov p53^{R175H} a p53^{R273H} bolo detegované zanedbateľné množstvo proteínov pod detekčným limitom prístroja, t.j. < 0,11 mg/ml. Prídavkom elúčného pufru na afinitnú kolónu dochádzalo k navýšeniu iónovej sily, čo viedlo k uvoľneniu proteínov z afinitnej kolóny. V poslednej elúcii bolo taktiež zaznamenané nízke množstvo proteínov pre mutanty p53^{R175H} a p53^{R273H}, čo naznačuje, že väčšina proteínov bola z kolóny uvoľnená v predchádzajúcich krokoch.

Tabuľka 4: Koncentrácia izolovaných proteínov piatich elúciách po izolácii afinitnou chromatografiou

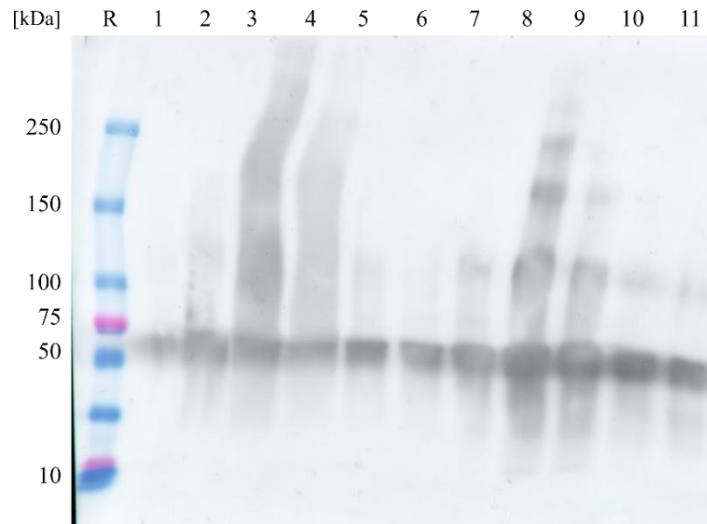
Proteín	Elúčna frakcia				
	c [mg/ml]				
	1.	2.	3.	4.	5.
wtp53	0,3880	0,8700	0,4475	0,1625	0,1355
p53 ^{R175H}	< 0,1100	0,2665	0,2325	0,1975	< 0,1100
p53 ^{R273H}		0,1990	0,2585	0,3820	

4.2.3 Detekcia proteínov

Izolované proteíny boli podrobené analýze. V prvom kroku boli separované v polyakrylamidovom géli s prídavkom SDS v procese denaturačnej PAGE-SDS. Po dokončení separácie boli proteíny z gélu prenesené na NC membránu imunoblotovaním. Na NC membránu bola aplikovaná primárna protilátka, ku ktorej bola následne pridaná sekundárna protilátka. Ako primárna protilátka bola použitá myšacia monoklonálna DO-1 v 5%

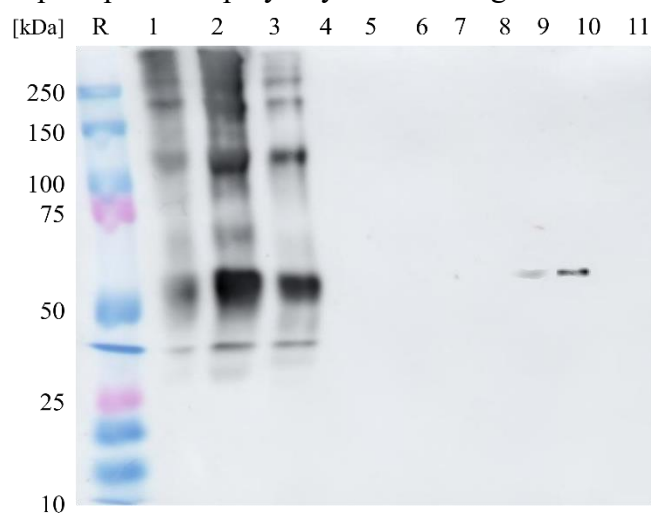
roztoku mlieka, ktoré bolo pripravené z 1x PBS pufru. Ako sekundárna protilátka bola volená kozia anti-myšacia peroxidáza v 5% roztoku mlieka.

Obrázok 10 zobrazuje membránu s proteínom wtp53 po chemiluminiscenčnej detekcii. Na obrázku je viditeľný silnejší signál v štarte č. 2 (kontrola po indukcii) než v štarte č. 1 (kontrola pred indukciou), podľa čoho môžeme usudzovať úspešnosť indukcie proteínu prídavkom IPTG a $ZnCl_2$. Signál zachytený v štartoch 7. až 11. odpovedajúci veľkosti približne 50 kDa napovedá tomu, že v každej elúčnej frakcii bola potvrdená prítomnosť proteínu wtp53.



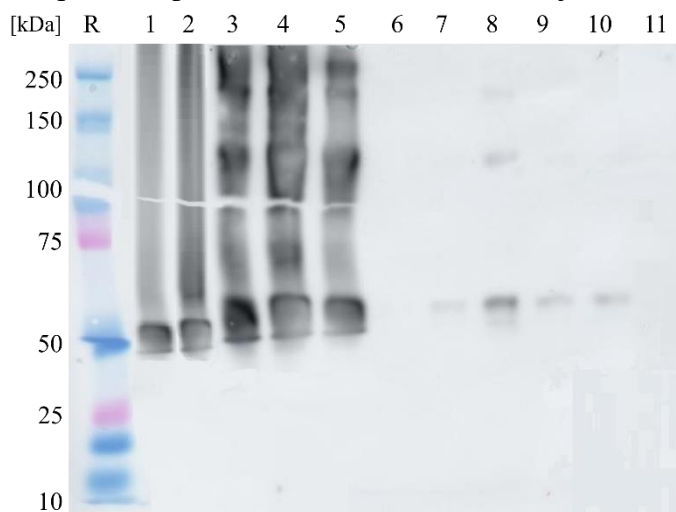
Obrázok 10: Proteín wtp53; NC membrána po imunoblote a chemiluminiscenčnej detekcii; R – proteínový rebríček o veľkosti 10 – 250 kDa; 1. kontrola pred indukciou, 2. kontrola po indukcii, 3. – 6. kontroly izolácie, 7. – 11. elúcie 1 až 5.

Na obrázku 11 je možné vidieť membránu s proteínom $p53^{R175H}$ po chemiluminiscenčnej detekcii. Porovnaním intenzity signálu v štarte č. 1 a č. 2 je zrejmé, že indukcia pomocou IPTG a $ZnCl_2$ bola úspešná. Na membráne sú viditeľné 2 signály v štarte č. 8 a č. 9, odpovedajúce druhej a tretej elúcii. Signály sú pozorovateľné v molekulovej oblasti nad 50 kDa, čo odpovedá známej veľkosti proteínu po separácii v polyakrylamidovom géli.



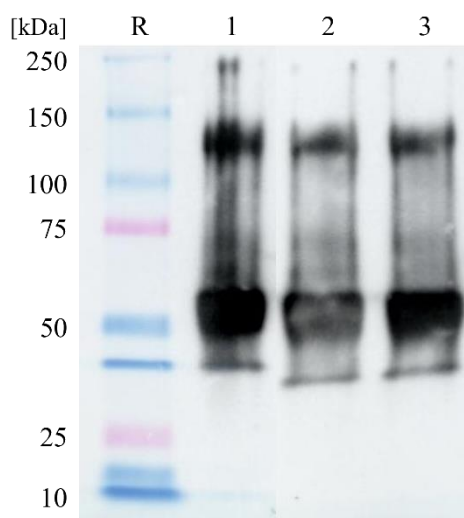
Obrázok 11: Proteín $p53^{R175H}$; NC membrána po imunoblote a chemiluminiscenčnej detekcii; R – proteínový rebríček o veľkosti 10 – 250 kDa; 1. kontrola pred indukciou, 2. kontrola po indukcii, 3. – 6. kontroly izolácie, 7. – 11. elúcie 1 až 5.

Ako tretí proteín bol chemiluminiscenčne detegovaný $p53^{R273H}$ (obrázok 12). Signál odpovedajúci kontrole po indukcii je výraznejší než kontrola pred indukciou, čo napovedá, že indukcia proteínu bola úspešná. Signál bol taktiež detegovaný v štartoch č. 7 až č. 10, ktoré odpovedajú elúciám 1. – 4. Všetky signály odpovedajú proteínu $p53^{R273H}$, pretože ležia v molekulovej oblasti približne 50 kDa. V štarte č. 8 sú okrem signálu o veľkosti 50 kDa pozorované aj ďalšie dva signály o veľkosti približne 120 kDa a 200 kDa. Signály môžu vypovedať o tom, že časť proteínu $p53^{R273H}$ mohla v bunkách zaujať zložitejšie štruktúry.



Obrázok 12: Proteín $p53^{R273H}$; NC membrána po imunoblote a chemiluminiscenčnej detekcii; R – proteínový rebríček o veľkosti 10 – 250 kDa; 1. kontrola pred indukciou, 2. kontrola po indukcii, 3. – 6. kontroly izolácie, 7. – 11. elúcie 1 až 5.

Následne bola vybratá jedna elúčna frakcia z každého izolovaného proteínu, ktorá bola opätovne detegovaná chemiluminiscenčne (obrázok 13). Pre wtp53 bola vybratá elúcia č. 2, pre $p53^{R175H}$ bola použitá elúcia č. 3 a pre $p53^{R273H}$ elúcia č. 4. Každá z vybraných elúcií bola druhýkrát potvrdená, a preto tieto elúcie príslušných proteínov boli používané pri sledovaní väzby proteínov k plazmidovej DNA.



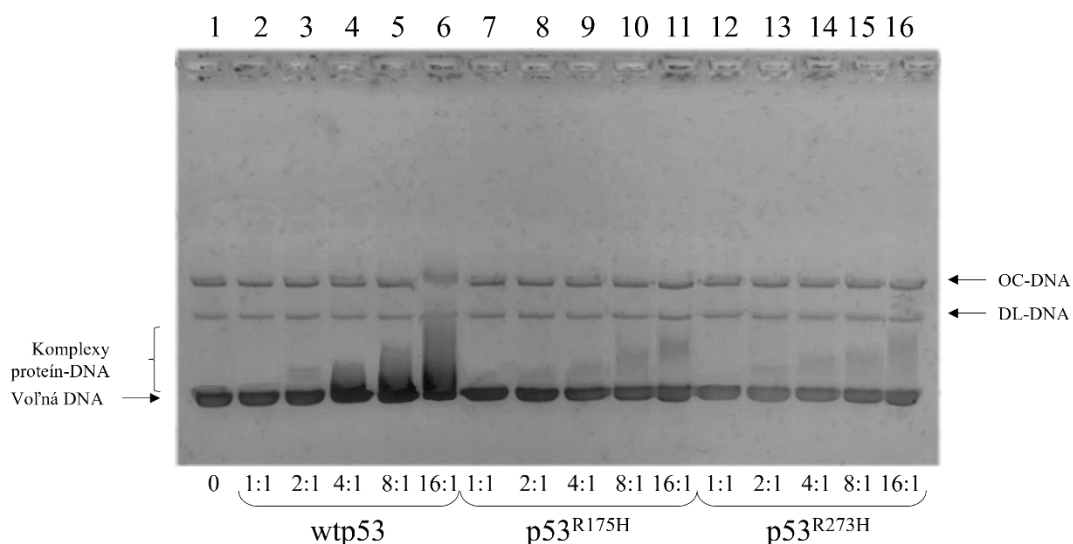
Obrázok 13: Chemiluminiscenčná detekcia vybraných elúcií jednotlivých proteínov; R – proteínový rebríček o veľkosti 10 – 250 kDa, 1. wtp53, 2. $p53^{R175H}$, 3. $p53^{R273H}$.

4.3 EMSA

Po potvrdení izolovaných proteínov bolo možné pristúpiť k väzbovej analýze. Prvá metóda sledovania väzbovej aktivity bola gélová retardačná analýza, ktorá prebiehala v prostredí 1% agarozového gélu, ktorý bol pripravený z 0,5x TBE pufru. Pomocou gélu bola sledovaná interakcia medzi proteínmi a vybranou plazmidovou DNA (tabuľka 3), ktoré boli pripravované v pomere molárnych koncentrácií proteín : DNA = 1:1, 2:1 4:1, 8:1, 16:1, kapitola 3.5.

Počas izolácie DNA je plazmidová DNA vystavovaná stresovým podmienkam – napr. pri lýze bakteriálnych buniek a pri premývacích krokoch, ktoré odstraňujú chromozomálnu DNA. Z tohto dôvodu sa môže jeden typ plazmidovej DNA pri izolácii vyskytovať vo viacerých podobách: superhelikálna DNA, inak nazývaná kovalentne uzavretá kruhová DNA (CCC-DNA, z angl.: „covalently closed circular“), relaxovaná, resp. DNA s otvoreným kruhom (OC-DNA, z angl.: „open circular“), lineárna DNA (L) a dendriméru podobná DNA (DL-DNA, z angl.: „dendrimer-like“) [128, 129]. Pre potreby gélovej retardačnej analýzy bola využívaná superhelikálna DNA. Na agarozových géloch boli avšak zachytené aj ďalšie signály, ktoré ale nepredstavujú väzbové interakcie. Signály odpovedajú iným štruktúram DNA. Signál o nižšej elektroforetickej mobilite patrí OC-DNA a signál s vyššou elektroforetickou mobilitou patrí DL-DNA.

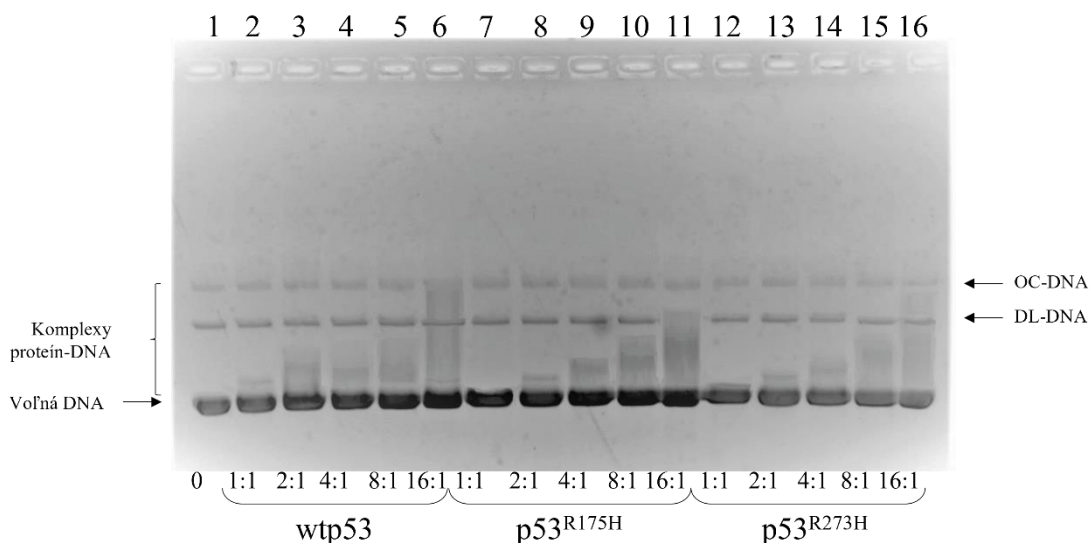
Na obrázku 14 je zachytená interakcia proteínov so superhelikálnou DNA – pBluescript SK II. K vytvoreniu komplexu dochádzalo už od pomere molárnych koncentrácií 2:1 pri wtp53 (štart č. 3). Pri mutantných proteínoch sa vytváral komplex od pomeru 8:1 (štart č. 10 pre p53^{R175H}, štart č. 15 pre p53^{R273H}). Porovnaním intenzity signálu komplexov proteín-DNA je možné usudzovať, že wtp53 vytváral viac komplexov s použitou plazmidovou DNA oproti p53^{R175H}, p53^{R273H}, medzi ktorými bola intenzita signálu rovnaká.



Obrázok 14: Interakcia proteínov p53 so superhelikálnou DNA – pBluescript SK II; 1. čistá DNA, 2. – 6. p53wt (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 7. – 11. p53^{R175H} (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 12. – 16. p53^{R273H} (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1); OC-DNA – DNA s otvoreným kruhom, DL-DNA – dendriméru podobná DNA.

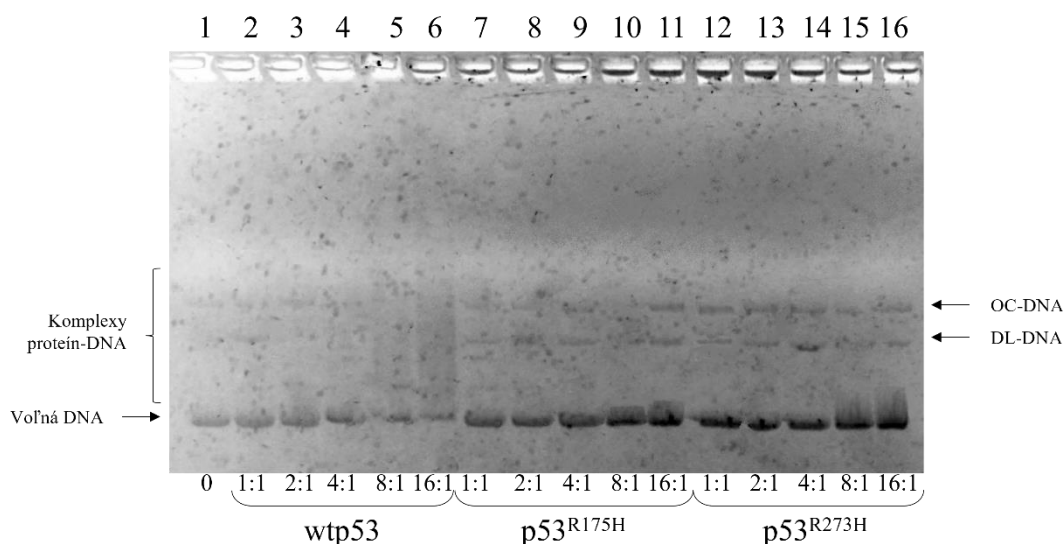
Proteíny wtp53, p53^{R175H} a p53^{R273H} vytvárali taktiež komplexy so superhelikálnou pPGM2 (obrázok 15). K vytvoreniu komplexov s wtp53 dochádzalo už od pomeru 2:1, čo naznačuje najsilnejšiu afinitu proteínov v porovnaní s ostatnými použitými plazmidovými DNA. Slabšia

intenzita signálu voľnej DNA pri $p53^{R273H}$ napovedá, že daný proteín sa k plazmidovej DNA viazal lepšie než $p53^{R175H}$.



Obrázok 15: Interakcia proteínov p53 so superhelikálnou DNA – pPGM2; 1. čistá DNA, 2. – 6. $p53^{wt}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 7. – 11. $p53^{R175H}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 12. – 16. $p53^{R273H}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), OC-DNA – DNA s otvoreným kruhom, DL-DNA – dindriméru podobná DNA.

Obrázok 16 reprezentuje interakciu skúmaných proteínov s krížovou štruktúrou pCFNO. K tvorbe väzby dochádzalo najlepšie pri $wtp53$, pri pomere koncentracii 16:1 (štart č. 6) dokonca nie je viditeľná žiadna voľná DNA, čo naznačuje že celé množstvo pCFNO interagovalo s $wtp53$. Na druhú stranu $mutp53$ reagovali s pCFNO v obmedzenej miere. Jediná interakcia bola pozorovaná v malom množstve DNA pri pomere 16:1 pre $p53^{R175H}$ (štart č. 11). Proteín $p53^{R273H}$ sa k pCFNO viazal lepšie, o čom napovedá detekovateľný signál pri pomere 8:1 a 16:1 (štart č. 15, č. 16).

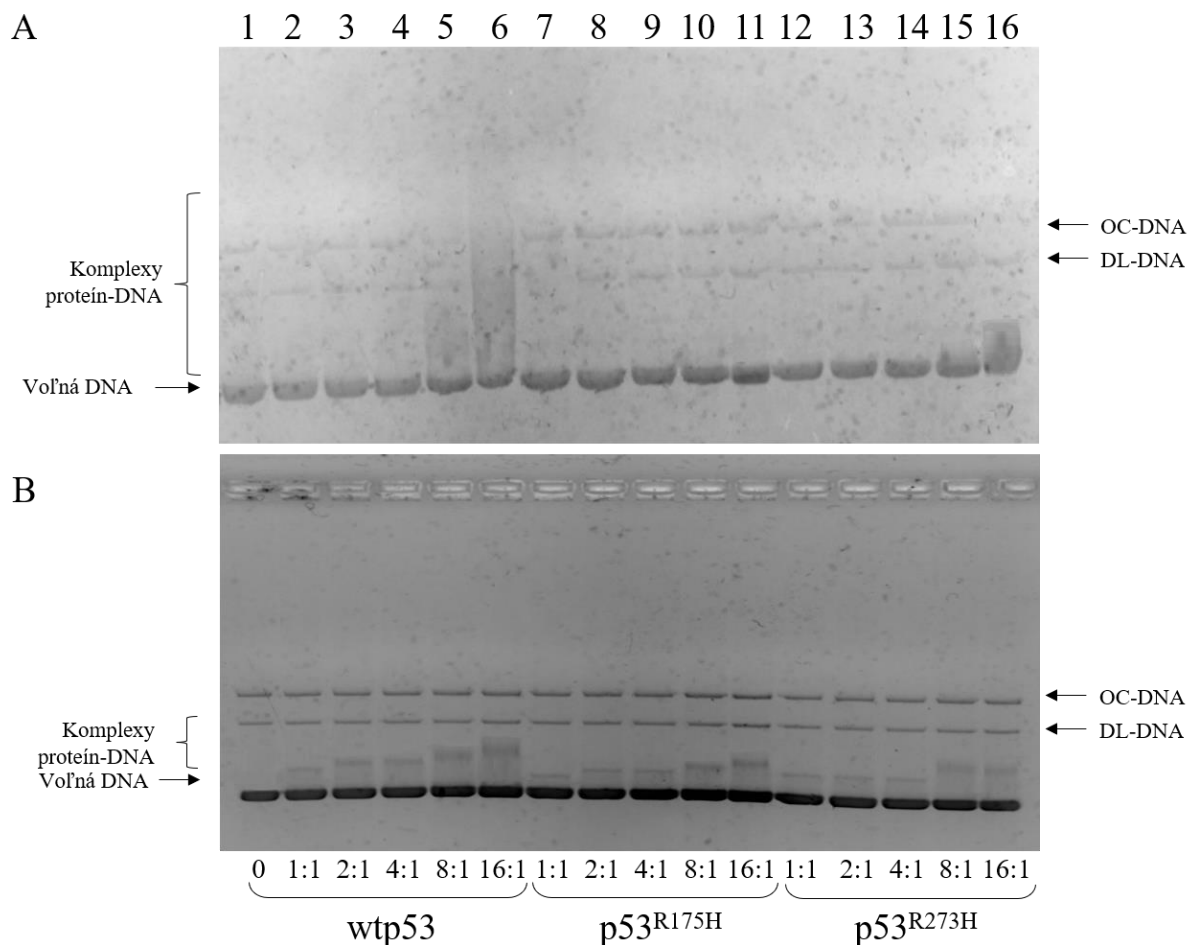


Obrázok 16: Interakcia proteínov p53 s krížovou štruktúrou DNA – pCFNO; 1. čistá DNA, 2. – 6. $p53^{wt}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 7. – 11. $p53^{R175H}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 12. – 16. $p53^{R273H}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), OC-DNA – DNA s otvoreným kruhom, DL-DNA – dindriméru podobná DNA.

Následne boli pozorované interakcie proteínov s kvadruplexovými štruktúrami – pB-6GC (obrázok 17A), p-B3Myc (obrázok 17B). Pri plazmide pB-6GC dochádzalo k tvorbe komplexu

s wtp53 od pomere 8:1, a preto bol signál pozorovateľný v štarte č. 5 (8:1) a č. 6 (16:1). Žiaden signál odpovedajúci vytvoreniu komplexu s $p53^{R175H}$ nebol pozorovaný v žiadnom pomere molárnych koncentrácií. Proteín $p53^{R273H}$ interagoval s pB-6GC v pomeroch 8:1 (štart č. 15) a 16:1 (štart č. 16), kde dochádzalo k vytvoreniu komplexu v obmedzenom množstve.

Proteíny boli pozorované aj s druhou kvadruplexovou štruktúrou p-B3Myc (Obrázok 17B). Na rozdiel od kvadruplexu pB-6GC (Obrázok 17A) je možné pozorovať silnejší signál pri každom proteíne. Wtp53 vytváral s p-B3Myc komplexy už od pomeru 2:1 (štart č. 3.). S p-B3Myc sa vytvárali komplexy aj mutanty. $p53^{R175H}$ sa podieľal na interakcii od pomeru 4:1 (štart č. 9) a proteín $p53^{R273H}$ už od pomeru 2:1 (štart č. 13).

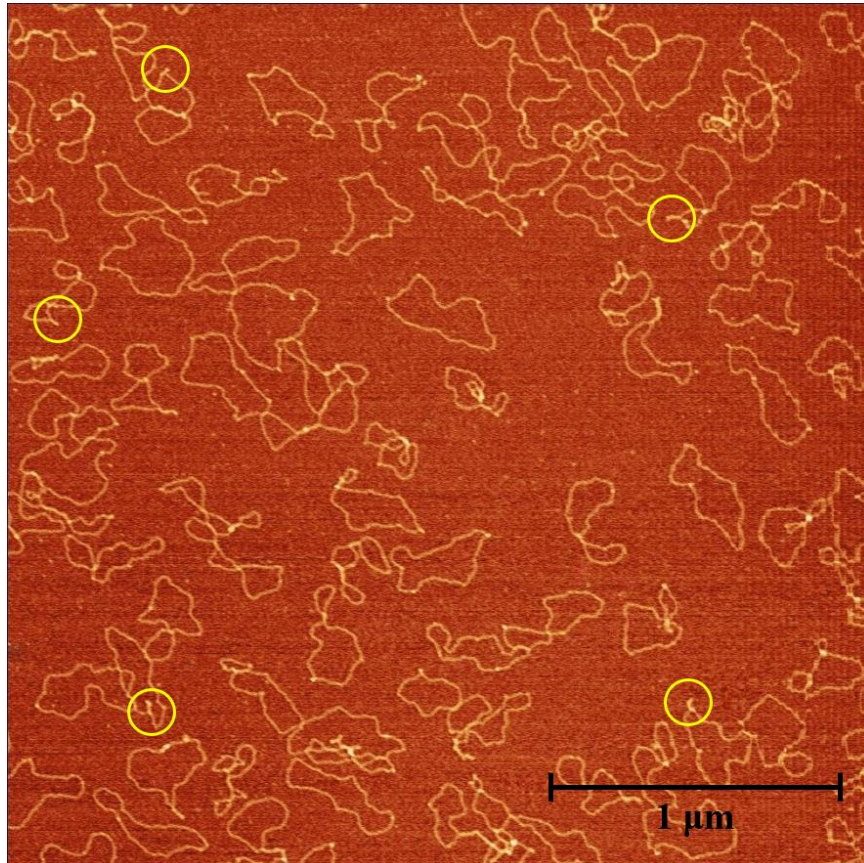


Obrázok 17: Interakcia proteínov p53 s G4 kvadruplexami – (A) pB-6GC, (B) p-B3Myc; 1. čistá DNA, 2. – 6. $p53^{wt}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 7. – 11. $p53^{R175H}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), 12. – 16. $p53^{R273H}$ (1:1, 2:1, 4:1, 8:1, 16:1), OC-DNA – DNA s otvoreným kruhom, DL-DNA – dindriméru podobná DNA.

4.4 AFM

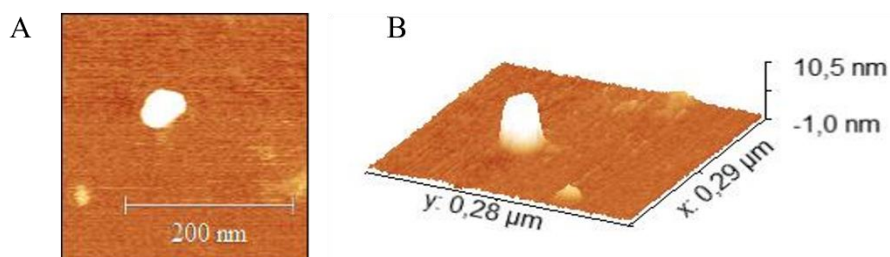
Mikroskopia atomárnych síl bola druhou metódou analýzy väzbových schopností proteínov. Pripravené vzorky DNA a proteínov boli zmiešané z AFM pufrom a nanosené na AFM terčik, ktorý bol následne inkubovaný so vzorkou. Po premytí a vysušení bol terčik umiestnený do mikroskopu, kde boli následne zachytávané snímky povrchu terčika o veľkosti 3 μm a rozlíšení 1024 x 1024 (kapitola 2.5.2).

Obrázok 18 zobrazuje celý snímok vo veľkosti 3 μm (mierka: 1 μm), ktorý bol mikroskopom vyhotovený. Snímka ukazuje len plazmidovú pCFNO bez prítomnosti proteínu. Svetlejšie miesta na štruktúre plazmidu predstavujú lokálnu štruktúru DNA alebo miesta, kde sa časti plazmidu prekrývajú. Niektoré motívy krížovej štruktúry DNA bolo znázornených na snímke pomocou žltej kružnice.



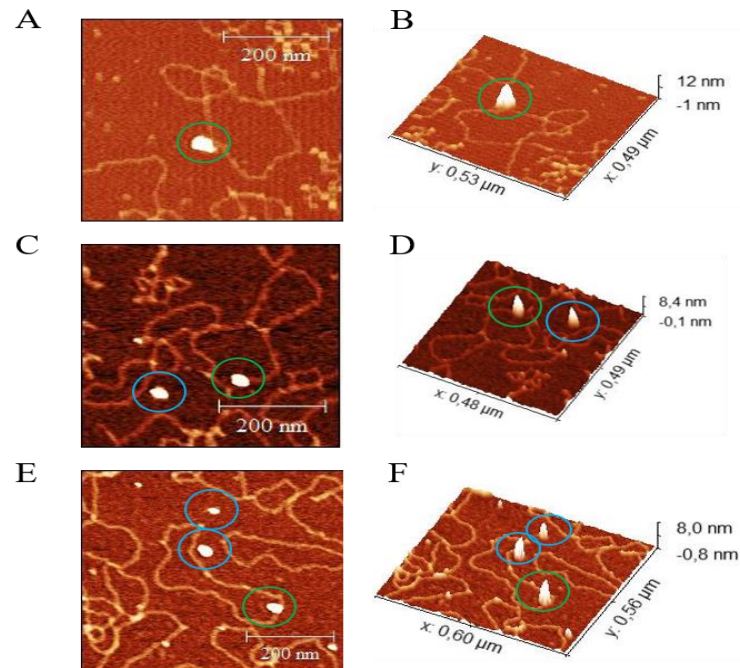
Obrázok 18: Snímka čistej plazmidovej pCFNO; Žltá kružnica označuje charakteristické motívy pre krížové štruktúry pCFNO; Parametre merania: 200 ng pCFNO; pomer p53 : DNA = 2:1, veľkosť snímky 3 μm , rozlíšenie 1024 x 1024.

Bola vyhotovená snímka, ktorá obsahovala proteín wtp53 bez plazmidovej DNA (obrázok 19). Snímka proteínu slúžia ako vzor pri posúdení úspešnosti tvorby komplexov. Porovnaním snímok čistého plazmidu a čistého proteínu je možné od seba jednoznačne odlišiť tieto molekuly. Proteín sa javí ako biely jasný tvar po väčšine kruhového charakteru. Proteín a DNA sa od seba líšili aj výškou (osa z). Priemerná výška proteínov, ktorá sa podieľala na tvorbe komplexov bola stanovená na 8,23 nm. Výška superhelikálnej DNA sa pohybuje v rozmedzí 1,1 – 1,2 nm [130].



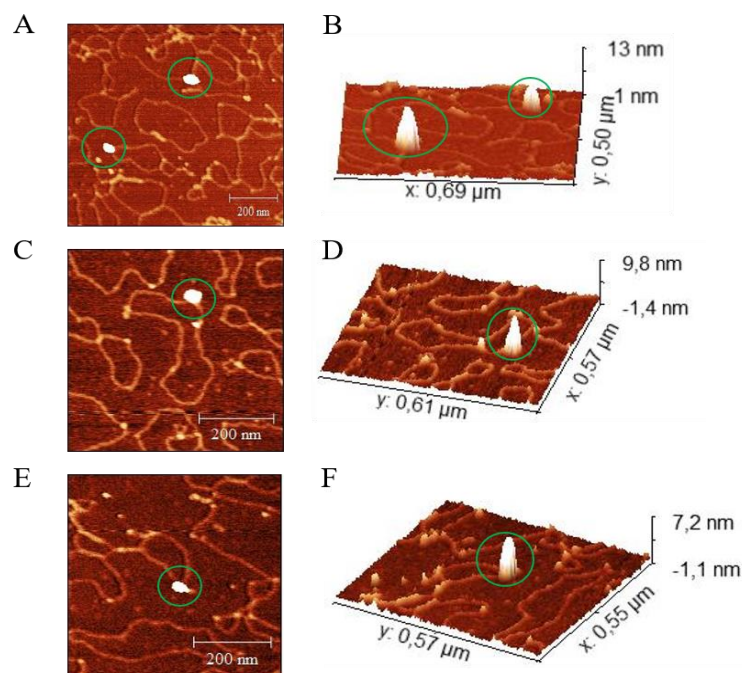
Obrázok 19: Snímka čistého proteínu wtp53; (A) 2D zobrazenie, (B) 3D zobrazenie.

Následne boli vyhotovované snímky o veľkosti 3 μm jednotlivej plazmidovej DNA v kombinácii s jedným proteínom. Zachytený komplex bol zo snímky vyrezaný. Obrázok 20 zobrazuje vzniknuté komplexy proteínov s DNA v 2D a 3D zobrazení, ktoré boli označené zelenou kružnicou. AFM snímky zachytávajú aj nenaviazané proteíny, zvýraznené modrou kružnicou.



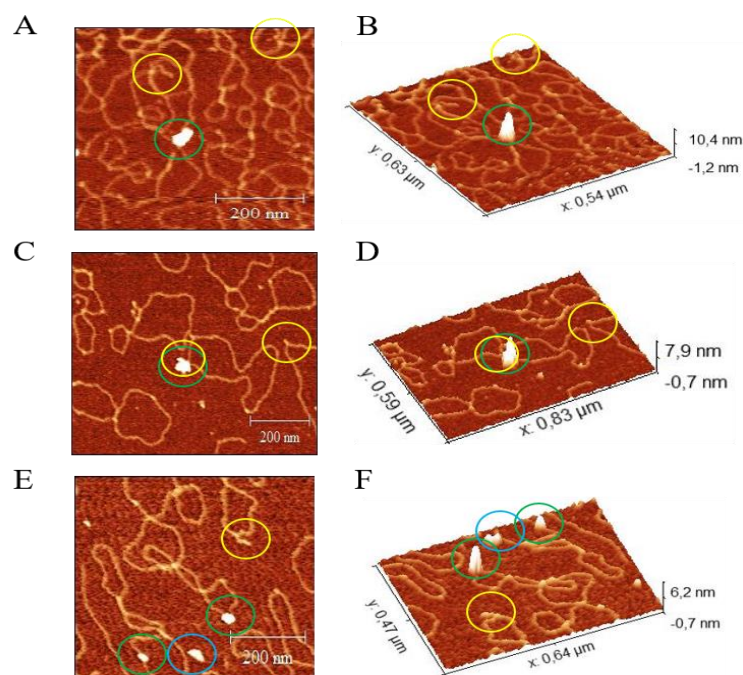
Obrázok 20: Interakcia plazmidovej DNA – pBluescript SK II ; (A) wtp53 v 2D zobrazení, (B) wtp53 v 3D zobrazení, (C) $p53^{R175H}$ v 2D, (D) $p53^{R175H}$ v 3D, (E) $p53^{R273H}$ v 2D, (F) $p53^{R273H}$ v 3D. Naviazané proteíny sú označené zelenou kružnicou. Modrá kružnica označuje nenaviazané proteíny. 3D snímky zobrazujú aj veľkosť komplexu proteín-DNA; Parametre merania: 200 ng pBluescript SK II; pomer $p53 : DNA = 2:1$, veľkosť pôvodnej snímky 3 μm , rozlíšenie 1024 x 1024.

Vytvorené komplexy proteínov s pPGM2 je možné vidieť na obrázku 21. Pri sérii experimentov, kde bola používaná plazmidová pPGM2 dochádzalo k väzbe väčšiny proteínov, ktoré boli pri danej veľkosti snímky zachytené.



Obrázok 21: Interakcia plazmidovej DNA – pPGM2; (A) wtp53 v 2D, (B) wtp53 v 3D, (C) p53^{R175H} v 2D, (D) p53^{R175H} v 3D, (E) p53^{R273H} v 2D, (F) p53^{R273H} v 3D. Naviazané proteíny sú označené zelenou kružnicou. 3D snímky zobrazujú aj veľkosť komplexu proteín-DNA; Parametre merania: 200 ng pPGM2; pomer p53 : DNA = 2:1, veľkosť pôvodnej snímky 3 μm, rozlíšenie 1024 x 1024.

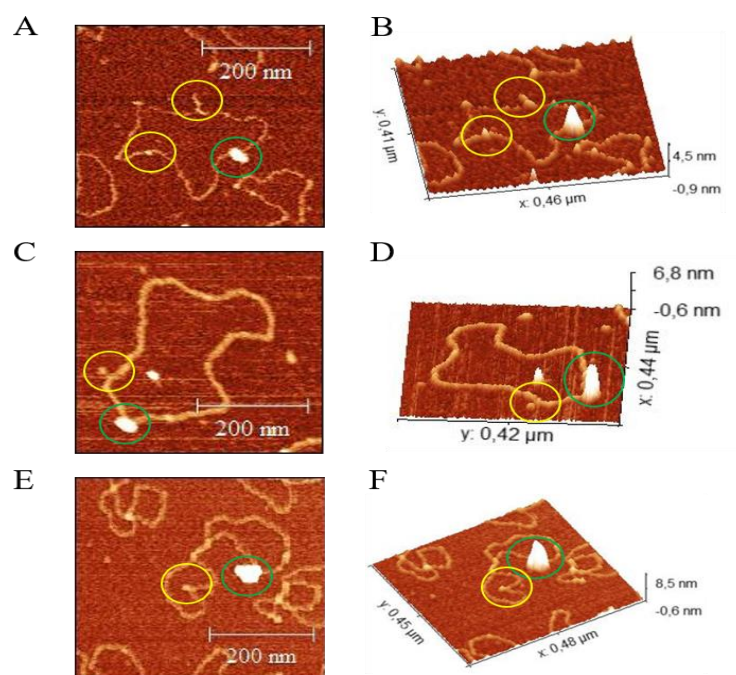
Obrázok 22 zachytáva komplexy medzi krížovou pCFNO a proteínmi. Na snímkach boli pozorované aj krížové motívy, ktoré sú označené žltou kružnicou. Proteín p53^{R175H} sa podieľal na vytvorení komplexu s DNA neďaleko od krížovej štruktúry (Obrázok 23C, D).



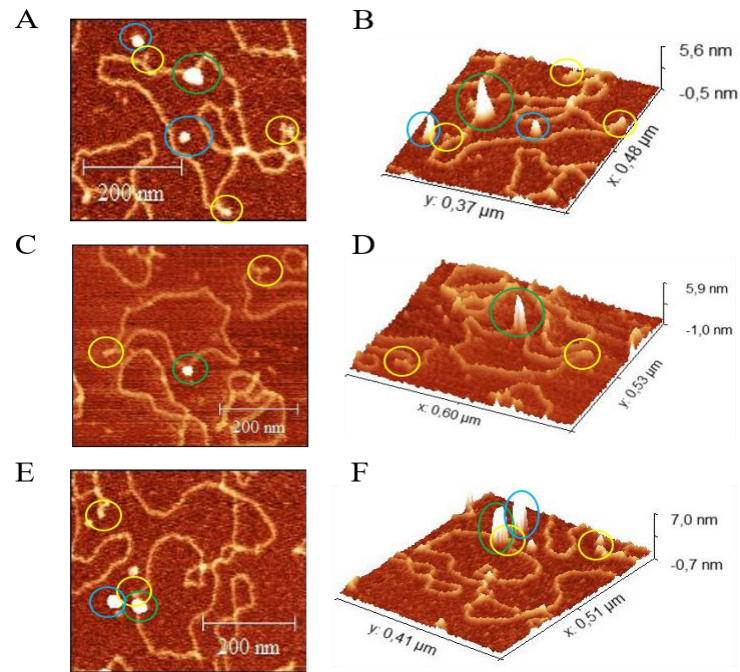
Obrázok 22: Interakcia plazmidovej DNA – pCFNO; (A) wtp53 v 2D, (B) wtp53 v 3D, (C) p53^{R175H} v 2D, (D) p53^{R175H} v 3D, (E) p53^{R273H} v 2D, (F) p53^{R273H} v 3D. Naviazané proteíny sú označené zelenou kružnicou. Modrá kružnica označuje nenaviazané proteíny. Žltá kružnica označuje charakteristické motívy pre krížové štruktúry pCFNO. 3D snímky zobrazujú aj veľkosť komplexu proteín-DNA;

Parametre merania: 200 ng pCFNO; pomer p53 : DNA = 2:1, veľkosť pôvodnej snímky 3 μm , rozlíšenie 1024 x 1024.

V obmedzenom množstve dochádzalo k vytvoreniu komplexov medzi proteínmi a DNA aj keď bola používaná kvadruplexová štruktúra pB-6GC (obrázok 23) a p-B3Myc (obrázok 24). Na obrázkoch sú viditeľné aj miesta na plazmide, ktoré reprezentujú kvadruplexovú štruktúru. Väčšina plazmidovej DNA sa k proteínom viazala miestami vzdialenými od kvadruplexu. V tesnej blízkosti kvadruplexu bola pozorovaná väzba proteínu p53^{R273H} s plazmidom p-B3Myc (obrázok 24E, F).



Obrázok 23: Interakcia kvadruplexovej DNA – pB-6GC; (A) wtp53 v 2D, (B) wtp53 v 3D, (C) p53^{R175H} v 2D, (D) p53^{R175H} v 3D, (E) p53^{R273H} v 2D, (F) p53^{R273H} v 3D. Naviazané proteíny sú označené zelenou kružnicou. Žltá kružnica označuje charakteristické motívy pre kvadruplexové štruktúry pB-6GC. 3D snímky zobrazujú aj veľkosť komplexu proteín-DNA; Parametre merania: 200 ng pB-6GC; pomer p53 : DNA = 2:1, veľkosť pôvodnej snímky 3 μm , rozlíšenie 1024 x 1024.



Obrázok 24: Interakcia kvadruplexovej DNA – *p-B3Myc*; (A) *wtp53* v 2D, (B) *wtp53* v 3D, (C) *p53^{R175H}* v 2D, (D) *p53^{R175H}* v 3D, (E) *p53^{R273H}* v 2D, (F) *p53^{R273H}* v 3D. Naviazané proteíny sú označené zelenou kružnicou. Modrá kružnica označuje nenaviazané proteíny. Žltá kružnica označuje charakteristické motívy pre kvadruplexové štruktúry *p-B3Myc*. 3D snímky zobrazujú aj veľkosť komplexu proteín-DNA; Parametre merania: 200 ng *p-B3Myc*; pomer *p53* : DNA = 2:1, veľkosť pôvodnej snímky 3 μ m, rozlíšenie 1024 x 1024.

4.5 Analýza transaktivačného potenciálu

Okrem väzbových schopností mutantných proteínov boli sledované aj transaktivačné vlastnosti. Za cieľ bolo zistiť, akú schopnosť transaktívacie majú *mutp53* oproti *wtp53*. Súčasne bolo pozorované správanie *mutp53* v koexpresii s *wtp53*.

Transaktivačné schopnosti proteínov boli sledované pomocou dvoch kvasinkových kmeňov PUMA a PUMA-KSHV. Do kvasiniek boli transformované plazmidy (tabuľka 2). Plazmidy boli namnožené pomocou baktérií *E.coli*, kapitola 3.2. Plazmidy boli transformované do kvasinkových kmeňov pomocou DMSO (kapitola 3.7).

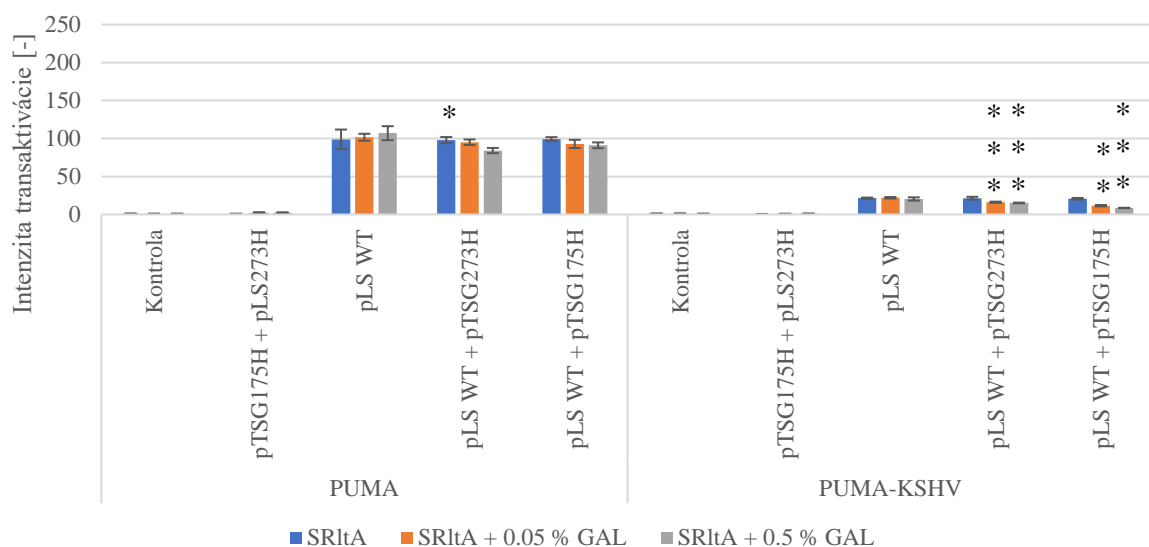
Intenzita transaktívacie predstavuje relatívnu veličinu, ktorou sa popisuje intenzita reportérovej analýzy (pomer expície luciferázy po transformácii buniek s vektorom, ktoré produkovali proteín oproti vektoru bez produkcie proteínu).

Na základe dosiahnutých výsledkov sa potvrdil predpoklad, že konštitutívna expícia v kmeni PUMA bola vyššia než konštitutívna expícia transaktivačného potenciálu (TP) v kmeni PUMA-KSHV. Rozdiel medzi expíciami kmeňov je možné vysvetliť prítomnosťou G4 kvadruplexu v sekvencii (obrázok 25) [131]. Naviazanie G4 kvadruplexu znemožňuje úplne obsadenie RE proteíny, čo vedie k nižšiemu signálu.



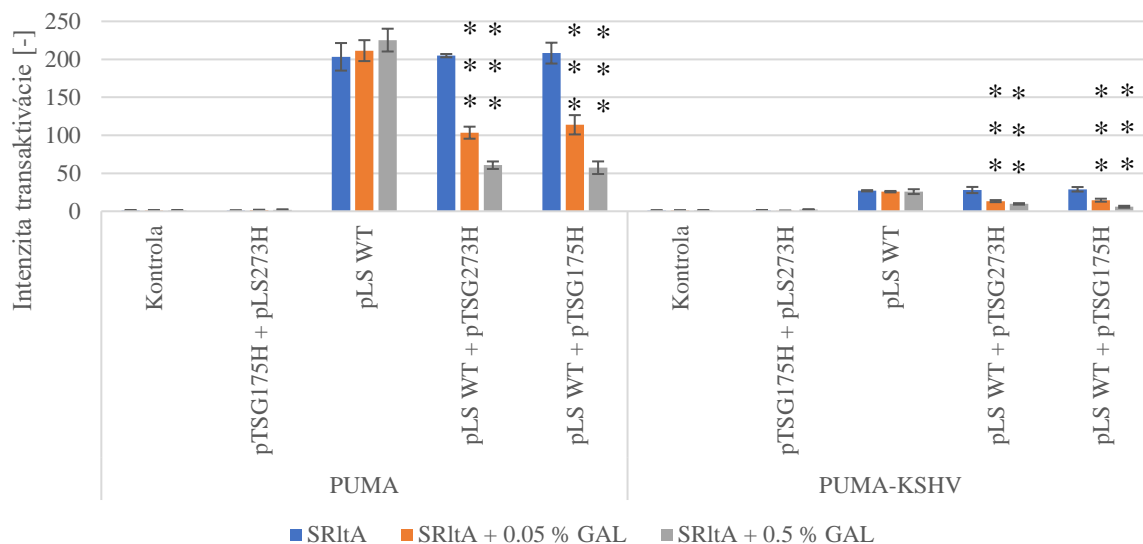
Obrázok 25: Schéma testovanej sekvencie; (A) kmeň PUMA, (B) kmeň PUMA-KSHV [131].

Graf 1 reprezentuje výsledky po 6 hodinách. Hodnoty TP konštitatívnej expresie sú stále rovnaké aj keď došlo k navýšeniu hodnoty oproti TP v čase 0 hodín. Súčasne je možné sledovať, že indukibilné vektory sú závislé na koncentrácii galaktózy v médiu. Prvé médium neobsahovalo galaktózu (SRItA médium), preto je hodnota TP pri všetkých vzorkách približne rovnaká. Druhé médium obsahovalo prídavok 0,05% galaktózy a tretie 0,5% galaktózy. Pri indukibilných vektoroch dochádza k znižovaniu hodnoty TP so zvyšujúcou koncentráciou galaktózy, čo môže byť spôsobené vplyvom expresie pod indukibilným promótorom. Samostatné mutanty (bez koexpresie s wt) nie sú schopné transaktivácie. Porovnaním vzoriek, ktoré obsahovali mutanty v koexpresii s wt v kvasinkových kmeňoch, je možné vidieť, že expresia mutantov spôsobuje zníženú schopnosť transaktivácie wt. Väčší inhibičný efekt je pozorovaný v kmeni PUMA-KSHV, ktorý obsahuje G4 sekvenciu.



Graf 1: Transaktivačný potenciál v čase 6 hodín; kontrola obsahuje prázdne plazmidy pRS-314 + pRS-315; hviezdičky označujú štatistickú významnosť stiahnutá k wtp53 pre príslušné médium (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Graf 2 obsahuje výsledky získané po 24 hodinách inkubácie. Oproti výsledkom v čase 0 a 6 hodín došlo k najvyššej konštitatívnej expresii. Po 24 hodinách dochádzalo k najväčšiemu poklesu TP so zvyšujúcou sa koncentráciou galaktózy v médiu. Ďalej sa potvrdzuje, že väčší inhibičný efekt bol zaznamenaný v koexpresii mutantu s wt pri kmeni PUMA-KSHV. V koexpresii s p53^{R273H} bol inhibičný efekt 7,2krát väčší a s p53^{R175H} bol inhibičný efekt 7,7krát väčší pri kmeni PUMA-KSHV v porovnaní s kmeňom PUMA.



Graf 2: Transaktivačný potenciál v čase 24 hodín; kontrola obsahuje prázdne plazmidy pRS-314 + pRS-315; hviezdičky označujú štatistickú významnosť stiahnutá k wtp53 pre príslušné médium (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5 ZÁVER

Cieľom predkladanej diplomovej práce bolo sledovanie vlastností mutp53. V teoretickej časti boli zhrnuté základné informácie o nemutovanej forme proteínu p53, kde bola rozoberaná jeho štruktúra a funkcie. Následne boli zosumarizované poznatky o mutp53 z hľadiska typov mutácií v géne *TP53*, bola vysvetlená možnosť proteínov získať nové funkcie, schopnosť modulovať metabolizmus, boli vysvetlené možnosti väzby proteínov k DNA a schopnosti transaktívácie. Teoretická časť ďalej obsahuje typy lokálnych štruktúr DNA a vysvetľuje použité metódy.

Praktická časť práce bola venovaná príprave a izolácii proteínov a DNA s obsahom lokálnych motívov. Jednotlivé proteíny boli úspešne izolované a imunologicky potvrdené. Takto pripravené proteíny bolo možné následne použiť k sledovaniu väzbových vlastností.

Pomocou metódy EMSA boli stanovené pomery molárnych koncentrácií, kde dochádzalo k tvorbe väzby medzi proteínmi a jednotlivými štruktúrami DNA. Bolo dokázané, že mutp53 majú slabšie väzbové vlastnosti v porovnaní s wtp53. Wtp53 interagoval so superhelikálnou DNA už od najnižších koncentrácií. Komplexy boli pozorované od pomeru 2:1, okrem interakcie s G-kvadruplexom v pb-6GC, kde interakcia prebiehala až od pomeru 8:1. mutp53 vytvárali komplexy až od vyšších molárnych koncentrácií, v niektorých prípadoch síce boli pozorované interakcie mutp53 pri rovnakom pomere ako pri wtp53, ale intenzita signálu bola vyššia pre wtp53, čo odzrkadľuje väčší počet vytvorených komplexov pri rovnakom pomere molárnych koncentrácií. Porovnaním výsledkov je možné usudzovať lepšie väzbové vlastnosti proteínu p53^{R273H} než p53^{R175H}, čo je pravdepodobne spôsobené typom mutácií. Proteín p53^{R175H} patrí do skupiny konformačných mutácií, ktoré skresľujú správne zloženie DNA väzbovej domény. Kontaktné mutácie proteínu p53^{R273H} prejavili menší inhibičný efekt pri vytváraní väzieb k DNA.

Správnosť väzbových výsledkov bola overená pomocou mikroskopie atomárnych síl. Na AFM snímkach boli okrem proteín-DNA komplexov zachytené aj charakteristické motívy DNA. Pri všetkých snímkach bolo možné pozorovať vytvorené komplexy proteín-DNA. Pri mutp53 bolo možné pozorovať vyššie množstvo nenaviazaných proteínov než pri wtp53.

K posúdeniu transaktivačných vlastností bola využitá analýza transaktivačného potenciálu. Bolo potvrdené, že kvasinkový kmeň PUMA má lepšie transaktivačné vlastnosti než kmeň PUMA-KSHV, z dôvodu neprítomnosti G4 kvadruplexu v sekvencii PUMA [131]. Hodnoty intenzity transaktívácie mutp53 napovedajú, že mutp53 nie sú schopný transaktívácie p53 RE. Pri koexpresii mutp53 a wtp53 dochádzalo k pozorovateľnému poklesu intenzity transaktívácie v porovnaní s konštitutívnou expresiou samotného wtp53. Je možné jednoznačne tvrdiť, že mutp53 sa vyznačujú inhibičným efektom samotného wtp53. Mutp53 v spojení s G4 kvadruplex majú synergetický efekt ovplyvňujúci transaktíváciu wtp53. V koexpresii s p53^{R273H} bol inhibičný efekt 7,2krát väčší pri kmeni PUMA-KSHV. V koexpresii p53^{R175H} bol inhibičný efekt 7,7krát väčší pri kmeni PUMA-KSHV.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] CHANG, C, D T SIMMONS, M A MARTIN a P T MORA. Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *Journal of Virology*. 1979, 31(2), 463-471.
- [2] KRESS, M, E MAY, R CASSINGENA a P MAY. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *Journal of Virology*. 1979, 31(2), 472-483.
- [3] LANE, D P a S BENCHIMOL. P53: oncogene or anti-oncogene?. 1990, 4(1), 1-8.
- [4] WILLIAMS, Ashley B. a Björn SCHUMACHER. P53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, 6(5), a026070.
- [5] AMUNDSON, Sally A, Timothy G MYERS a Albert J FORNACE. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*. 1998, 17(25), 3287-3299.
- [6] SMEBY, Jørgen, Anita SVEEN, Ina A. EILERTSEN, et al. Transcriptional and functional consequences of TP53 splice mutations in colorectal cancer. *Oncogenesis*. 2019, 8(6), 35.
- [7] PAN, Mengwu, Christine BLATTNER, Ina A. EILERTSEN, et al. Regulation of p53 by E3s. *Cancers*. 2021, 13(4), 745.
- [8] WHITE, Katharine A., Diego Garrido RUIZ, Zachary A. SZPIECH, et al. Cancer-associated arginine-to-histidine mutations confer a gain in pH sensing to mutant proteins. *Science Signaling*. 2017, 10(495), eaam9931.
- [9] EVINE, Arnold J., Moshe OREN, R CASSINGENA a P MAY. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*. 2009, 9(10), 749-758.
- [10] SUN, Zheyang, Moshe OREN, R CASSINGENA a P MAY. The General Information of the Tumor Suppressor Gene p53 and the Protein p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*. 2015, 3(1), 749-758.
- [11] KHOURY, M. P. a J.-C. BOURDON, 2011. P53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor. 2(4), 453-465.
- [12] UESUGI, M. a G. L. VERDINE. The alpha -helical FXXPhi Phi motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, 96(26), 14801-14806.
- [13] ANDERSON, Carl W. a Ettore APPELLA. Signaling to the p53 Tumor Suppressor through Pathways Activated by Genotoxic and Nongenotoxic Stresses. *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, 2003, 2003, 237-247.
- [14] VENOT, C. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *The EMBO Journal*. 17(16), 4668-4679.
- [15] WANG, Y, M REED, P WANG, J E STENGER, G MAYR, M E ANDERSON, J F SCHWEDES a P TEGTMEYER. P53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. 1993, 7(12b), 2575-2586.
- [16] PAVLETICH, N P, K A CHAMBERS a C O PABO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. 1993, 7(12b), 2556-2564.

- [17] KLEIN, Christian, Eckart PLANKER, Tammo DIERCKS, Horst KESSLER, Klaus-Peter KÜNKELE, Kurt LANG, Silke HANSEN a Manfred SCHWAIGER. NMR Spectroscopy Reveals the Solution Dimerization Interface of p53 Core Domains Bound to Their Consensus DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(52), 49020-49027.
- [18] JEFFREY, P., S. GORINA, N. PAVLETICH, Horst KESSLER, Klaus-Peter KÜNKELE, Kurt LANG, Silke HANSEN a Manfred SCHWAIGER. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*. 1995, 267(5203), 1498-1502.
- [19] KAGHAD, Mourad, Helene BONNET, Annie YANG, et al. Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers: growing ever more complex. *Cell*. 1997, 90(4), 809-819.
- [20] DE LAURENZI, Vincenzo, Antonio COSTANZO, Daniela BARCAROLI, et al. Two New p73 Splice Variants, γ and δ , with Different Transcriptional Activity: growing ever more complex. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, 188(9), 1763-1768.
- [21] LEVRERO, M., V. DE LAURENZI, A. COSTANZO, et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of Cell Science*. 2000, 113(10), 1661-1670.
- [22] ENGLAND, Bryant, Tianguai HUANG a Michael KARSY. Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme. *Tumor Biology*. 2013, 34(4), 2063-2074.
- [23] CELLI, Jacopo, Pascal DUIJF, Ben C.J HAMEL, et al. Heterozygous Germline Mutations in the p53 Homolog p63 Are the Cause of EEC Syndrome. *Cell*. 1999, 99(2), 143-153.
- [24] IKAWA, S, A NAKAGAWARA, Y IKAWA, et al. P53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell*. 1999, 6(12), 1154-1161.
- [25] HUSSAIN, S. Perwez a Curtis C. HARRIS. Molecular Epidemiology of Human Cancer: Contribution of Mutation Spectra Studies of Tumor Suppressor Genes. *Cancer research*. 1998, 58(18), 4023-4037.
- [26] VOGELSTEIN, Bert, David LANE a Arnold J. LEVINE. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, 408(6810), 307-310.
- [27] VOUSDEN, Karen H., Xin LU a Arnold J. LEVINE. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*. 2002, 2(8), 594-604.
- [28] BÉROUD, Christophe a Thierry SOUSSI. The UMD-p53 database: New mutations and analysis tools. *Human Mutation*. 2003, 21(3), 176-181.
- [29] JONES, Russell G., David R. PLAS, Sara KUBEK, Monica BUZZAI, James MU, Yang XU, Morris J. BIRNBAUM a Craig B. THOMPSON. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint: New mutations and analysis tools. *Molecular Cell*. 2005, 18(3), 283-293.
- [30] SERRANO, Manuel, Athena W LIN, Mila E MCCURRACH, David BEACH, Scott W LOWE, Yang XU, Morris J. BIRNBAUM a Craig B. THOMPSON. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a: New mutations and analysis tools. *Cell*. 1997, 88(5), 593-602.

- [31] BELL, Stefan, Christian KLEIN, Lin MÜLLER, Silke HANSEN, Johannes BUCHNER, Yang XU, Morris J. BIRNBAUM a Craig B. THOMPSON. P53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State: New mutations and analysis tools. *Journal of Molecular Biology*. 2002, 322(5), 917-927.
- [32] MOMAND, Jamil, Gerard P. ZAMBETTI, David C. OLSON, Donna GEORGE, Arnold J. LEVINE, Yang XU, Morris J. BIRNBAUM a Craig B. THOMPSON. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation: New mutations and analysis tools. *Cell*. 1992, 69(7), 1237-1245.
- [33] ITAHANA, Koji, Goberdhan DIMRI, Judith CAMPISI, Donna GEORGE, Arnold J. LEVINE, Yang XU, Morris J. BIRNBAUM a Craig B. THOMPSON. Regulation of cellular senescence by p53: New mutations and analysis tools. *European Journal of Biochemistry*. 2001, 268(10), 2784-2791.
- [34] IKEGUCHI, Masahide, Hiroaki SAITO, Kuniyuki KATANO, Shunichi TSUJITANI, Michio MAETA, Nobuaki KAIBARA, Morris J. BIRNBAUM a Craig B. THOMPSON. Regulation of cellular senescence by p53: New mutations and analysis tools. *Digestive Diseases and Sciences*. 2001, 43(5), 964-970.
- [35] PETER, M E a P H KRAMMER. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. 2003, 10(1), 26-35.
- [36] KROEMER, Guido a John C. REED. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*. 2000, 6(5), 513-519.
- [37] TSUJIMOTO, Yoshihide. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal of Cellular Physiology*. 2003, 195(2), 158-167.
- [38] FRIDMAN, Jordan S a Scott W LOWE. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*. 2003, 22(56), 9030-9040.
- [39] AYLON, Yael a Moshe OREN. New plays in the p53 theater. 2011, 21(1), 86-92.
- [40] ROTTER, V. a Moshe OREN. P53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1983, 80(9), 2613-2617.
- [41] BÁRTEK, J, J BÁRTKOVÁ, B BÁRTKOVÁ, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. 1991, 6(9), 1699-1703.
- [42] OLIVIER, M., M. HOLLSTEIN a P. HAINAUT. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, 2(1), a001008-a001008.
- [43] BULLOCK, Alex N. a Alan R. FERSHT. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Reviews Cancer*. 2001, 1(1), 68-76.
- [44] MULLER, Patricia A.J. a Karen H. VOUSDEN. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell*. 2014, 25(3), 304-317.
- [45] TAN, B S, K H TIONG, H L CHOO, et al. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). 2015, 6(7), e1826-e1826.

- [46] MOSCETTI, Ilaria, Anna Rita BIZZARRI a Salvatore CANNISTRARO. Binding kinetics of mutant p53R175H with wild type p53 and p63: A Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Spectroscopy study. *Biophysical Chemistry*. 2017, 228, 55-61.
- [47] BROSH, Ran a Varda ROTTER. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer*. 2009, 9(10), 701-713.
- [48] MULLER, Patricia A.J. a Karen H. VOUSDEN. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell*. 2014, 25(3), 304-317.
- [49] WOLF, D, N HARRIS, N GOLDFINGER a V ROTTER. Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. *Molecular and Cellular Biology*. 1985, 5(1), 127-132.
- [50] LANG, Gene A., Tomoo IWAKUMA, Young-Ah SUH, et al. Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell*. 2004, 119(6), 861-872.
- [51] OLIVE, Kenneth P., David A. TUVESON, Zachary C. RUHE, et al. Mutant p53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell*. 2004, 119(6), 847-860.
- [52] MANTOVANI, Fiamma, Dawid WALERYCH a Giannino Del SAL. Targeting mutant p53 in cancer: a long road to precision therapy. *The FEBS Journal*. 2017, 284(6), 837-850.
- [53] KIM, Michael P, Guillermina LOZANO a Giannino Del SAL. Mutant p53 partners in crime: a long road to precision therapy. *The FEBS Journal*. 2018, 25(1), 161-168.
- [54] WALERYCH, D., M. NAPOLI, L. COLLAVIN a G. DEL SAL. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012, 33(11), 2007-2017.
- [55] WALERYCH, Dawid, Kamil LISEK, Giannino DEL SAL a G. DEL SAL. Mutant p53: One, No One, and One Hundred Thousand. *Frontiers in Oncology*. 2015, 5(11), 2007-2017.
- [56] FREED-PASTOR, W. A., C. PRIVES a Steven M. ROWE. Mutant p53: one name, many proteins. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, 26(12), 1268-1286.
- [57] SHARMA, Jyoti, Kim M. KEELING a Steven M. ROWE. Pharmacological approaches for targeting cystic fibrosis nonsense mutations. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, 200.
- [58] COMO, Charles J Di, Carol PRIVES a Steven M. ROWE. Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay: one name, many proteins. *Oncogene*. 1998, 16(19), 2527-2539.
- [59] HANAHAN, Douglas, Robert A. WEINBERG a C. B. THOMPSON. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, 144(5), 646-674.
- [60] VANDER HEIDEN, M. G., L. C. CANTLEY a C. B. THOMPSON. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009, 324(5930), 1029-1033.
- [61] GOLDSTEIN, Ido, Keren YIZHAK, Shalom MADAR, Naomi GOLDFINGER, Eytan RUPPIN a Varda ROTTER. P53 promotes the expression of gluconeogenesis-related genes and enhances hepatic glucose production: The Next Generation. *Cell*. 2013, 1(1), 646-674.

- [62] TRAN, T Q, X H LOWMAN, M A REID, et al. Tumor-associated mutant p53 promotes cancer cell survival upon glutamine deprivation through p21 induction: The Next Generation. *Oncogene*. 2017, 36(14), 732-742.
- [63] ZHOU, Ge, Jiping WANG, Mei ZHAO, et al. Gain-of-Function Mutant p53 Promotes Cell Growth and Cancer Cell Metabolism via Inhibition of AMPK Activation: The Next Generation. *Molecular Cell*. 2014, 54(6), 960-974.
- [64] CHRYPLEWICZ, Agnieszka, Samantha M. TIENDA, Dominik A. NAHOTKO, Pamela N. PETERS, Ernst LENGYEL a Mark A. ECKERT. Mutant p53 regulates LPA signaling through lysophosphatidic acid phosphatase type 6. *Scientific Reports*. 2019, 9(1), 5195.
- [65] FREED-PASTOR, William A., Hideaki MIZUNO, Xi ZHAO, et al. Mutant p53 Disrupts Mammary Tissue Architecture via the Mevalonate Pathway. *Cell*. 2012, 148(1-2), 244-258.
- [66] FREED-PASTOR, William a Carol PRIVES. Targeting mutant p53 through the mevalonate pathway. *Nature Cell Biology*. 2016, 18(11), 1122-1124.
- [67] LIOU, Geou-Yarh a Peter STORZ. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. 2010, 44(5), 479-496.
- [68] KALO, Eyal, Ira KOGAN-SAKIN, Hilla SOLOMON, et al. Mutant p53R273H attenuates the expression of phase 2 detoxifying enzymes and promotes the survival of cells with high levels of reactive oxygen species. *Journal of Cell Science*. 2012, 125(22), 5578-5586.
- [69] ZHANG, Cen, Juan LIU, Yingjian LIANG, et al. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature Communications*. 2013, 4(1), 2935.
- [70] RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, Sara, Álvaro MARÍN-HERNÁNDEZ, Juan Carlos GALLARDO-PÉREZ, et al. Transcriptional Regulation of Energy Metabolism in Cancer Cells. *Cells*. 2019, 8(10), 1225.
- [71] POYUROVSKY, M. V. Unleashing the power of p53: lessons from mice and men. 2006, 20(2), 125-131.
- [72] OREN, M. a V. ROTTER. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer: lessons from mice and men. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, 2(2), a001107-a001107.
- [73] PANT, V., S. XIONG, J. G. JACKSON, S. M. POST, H. A. ABBAS, A. QUINTAS-CARDAMA, A. N. HAMIR a G. LOZANO. The p53-Mdm2 feedback loop protects against DNA damage by inhibiting p53 activity but is dispensable for p53 stability, development, and longevity: lessons from mice and men. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013, 27(17), 1857-1867.
- [74] TOMMASINO, Massimo, Rosita ACCARDI, Sandra CALDEIRA, et al. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Human Mutation*. 2003, 21(3), 307-312.
- [75] JONES, S., X. ZHANG, D. W. PARSONS, et al. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science*. 2008, 321(5897), 1801-1806.
- [76] HAINAUT, Pierre a Monica HOLLSTEIN. P53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. Elsevier, 1999, 1999, , 81-137. *Advances in Cancer Research*.

- [77] LI, FP, JF Jr FRAUMENI, JJ MULVIHILL, WA BLATTNER, MG DREYFUS, MA TUCKER a RW MILLER. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer research*. 48(18), 5358–536.
- [78] OLIVIER, Magali, David E GOLDGAR, Nayanta SODHA, Hiroko OHGAKI, Paul KLEIHUES, Pierre HAINAUT a Rosalind A EELES. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*. 2003, 63(20), 6643-6650.
- [79] BOUGEARD, Gaëlle, Laurence BRUGIÈRES, Agnès CHOMPRET, et al. Screening for TP53 rearrangements in families with the Li–Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. *Oncogene*. 2003, 22(6), 840-846.
- [80] KATO, Shunsuke, Shuang-Yin HAN, Wen LIU, Kazunori OTSUKA, Hiroyuki SHIBATA, Ryunosuke KANAMARU a Chikashi ISHIOKA. Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, 100(14), 8424-8429.
- [81] KANG, H.-J., Z. FENG, Y. SUN, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(24), 9761-9766.
- [82] JOERGER, Andreas C. a Alan R. FERSHT. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry*. 2008, 77(1), 557-582.
- [83] BOECKLER, F. M., A. C. JOERGER, G. JAGGI, T. J. RUTHERFORD, D. B. VEPRINTSEV a A. R. FERSHT. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, 105(30), 10360-10365.
- [84] LIU, Xiangrui, Rainer WILCKEN, Andreas C. JOERGER, Irina S. CHUCKOWREE, Jahangir AMIN, John SPENCER a Alan R. FERSHT. Small molecule induced reactivation of mutant p53 in cancer cells. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41(12), 6034-6044.
- [85] BYKOV, Vladimir J.N., Natalia ISSAEVA, Alexandre SHILOV, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine*. 2002, 8(3), 282-288.
- [86] DEMMA, Mark, Eugene MAXWELL, Robert RAMOS, et al. SCH529074, a Small Molecule Activator of Mutant p53, Which Binds p53 DNA Binding Domain (DBD), Restores Growth-suppressive Function to Mutant p53 and Interrupts HDM2-mediated Ubiquitination of Wild Type p53. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, 285(14), 10198-10212.
- [87] FOSTER, B. A. Pharmacological Rescue of Mutant p53 Conformation and Function. *Science*. 286(5449), 2507-2510.
- [88] SUH, Young-Ah, Sean M. POST, Ana C. ELIZONDO-FRAIRE, et al. Multiple Stress Signals Activate Mutant p53 In Vivo. *Cancer Research*. 2011, 71(23), 7168-7175.
- [89] MIZUSHIMA, Noboru, Beth LEVINE, Ana Maria CUERVO, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008, 451(7182), 1069-1075.

- [90] RODRIGUEZ, Olga Catalina, Sujatra CHOUDHURY, Vamsi KOLUKULA, et al. Dietary downregulation of mutant p53 levels via glucose restriction. *Cell Cycle*. 2014, 11(23), 4436-4446.
- [91] KRAVCHENKO, J. E., G. V. ILYINSKAYA, P. G. KOMAROV, et al. Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, 105(17), 6302-6307.
- [92] SCIAN, Mariano J, Katherine E R STAGLIANO, Debabrita DEB, et al. Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene*. 2004, 23(25), 4430-4443.
- [93] EL-DEIRY, Wafik S., Scott E. KERN, Jennifer A. PIETENPOL, Kenneth W. KINZLER a Bert VOGELSTEIN. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics*. 1992, 1(1), 45-49.
- [94] CHO, Y, S GORINA, P. JEFFREY a N. PAVLETICH. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994, 265(5170), 346-355.
- [95] KIM, E, W DEPERT, P. JEFFREY a N. PAVLETICH. Interactions of mutant p53 with DNA: guilt by association. *Oncogene*. 2007, 26(15), 2185-2190.
- [96] CHICAS, Agustin, Patricia MOLINA a Jill BARGONETTI. Mutant p53 Forms a Complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, 279(2), 383-390.
- [97] DI AGOSTINO, Silvia, Sabrina STRANO, Velia EMILIOZZI, Valentina ZERBINI, Marcella MOTTOLESE, Ada SACCHI, Giovanni BLANDINO a Giulia PIAGGIO. Gain of function of mutant p53: The mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell*. 2006, 10(3), 191-202.
- [98] PANG, Jong Hwei, Lifeng GOOD a Kuang Yu CHEN. The age-dependent binding of CBP/tpk, a ccaat binding protein, is deregulated in transformed and immortalized mammalian cells but absent in premature aging cells. *Experimental Gerontology*. 1996, 31(1-2), 97-109.
- [99] OIKAWA, Tsuneyuki. ETS transcription factors: Possible targets for cancer therapy. *Cancer Science*. 2004, 95(8), 626-633.
- [100] SAMPATH, Janardhan, Daxi SUN, Vincent J. KIDD, et al. Mutant p53 Cooperates with ETS and Selectively Up-regulates Human MDR1 Not MRP1: Possible targets for cancer therapy. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(42), 39359-39367.
- [101] KOUTSODONTIS, George, Eleftheria VASILAKI, Wan-Chih CHOU, et al. Physical and functional interactions between members of the tumour suppressor p53 and the Sp families of transcription factors: importance for the regulation of genes involved in cell-cycle arrest and apoptosis. *Biochemical Journal*. 2005, 389(2), 443-455.
- [102] MENENDEZ, D, A INGA, J J JORDAN, et al. Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. *Oncogene*. 2007, 26(15), 2191-2201.
- [103] KIM, Ella, Wolfgang DEPERT, J J JORDAN, et al. Transcriptional activities of mutant p53: When mutations are more than a loss. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004, 93(5), 878-886.

- [104] WALTER, Korden, Gabriele WARNECKE, Richard BOWATER, et al. Tumor Suppressor p53 Binds with High Affinity to CTG·CAG Trinucleotide Repeats and Induces Topological Alterations in Mismatched Duplexes*: When mutations are more than a loss. *Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280(52), 42497-42507.
- [105] GÖHLER, Thomas, Maurice REIMANN, Dimitry CHERNY, et al. Specific Interaction of p53 with Target Binding Sites Is Determined by DNA Conformation and Is Regulated by the C-terminal Domain: When mutations are more than a loss. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277(43), 41192-41203.
- [106] BAE, Byoung-II, Hong XU, Shuichi IGARASHI, et al. P53 Mediates Cellular Dysfunction and Behavioral Abnormalities in Huntington's Disease: When mutations are more than a loss. *Neuron*. 2005, 47(1), 29-41.
- [107] FENG, Z, S JIN, A ZUPNICK, et al. P53 tumor suppressor protein regulates the levels of huntingtin gene expression: When mutations are more than a loss. *Oncogene*. 2006, 25(1), 1-7.
- [108] WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, 171(4356), 737-738.
- [109] BRÁZDA, Václav a Jan COUFAL. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(2), 375.
- [110] CER, R. Z., K. H. BRUCE, U. S. MUDUNURI, et al. Non-B DB: a database of predicted non-B DNA-forming motifs in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*. 2010, 39(Database), D383-D391.
- [111] ARANDA, A, J E PÉREZ-ORTÍN, C J BENHAM a M L DEL OLMO. Analysis of the structure of a natural alternating d(TA)_n sequence in yeast chromatin. *Yeast*. 1997, 13(4), 313-26.
- [112] BRÁZDA, Václav, Rob C LAISTER, Eva B JAGELSKÁ a Cheryl ARROWSMITH. Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes. *BMC Molecular Biology*. 2011, 12(1).
- [113] FRANK-KAMENETSKII, Maxim D. a Sergei M. MIRKIN. TRIPLEX DNA STRUCTURES. *Annual Review of Biochemistry*. 1995, 64(1), 65-95.
- [114] MUKHERJEE, Anirban a Karen M. VASQUEZ. Triplex technology in studies of DNA damage, DNA repair, and mutagenesis. *Biochimie*. 2011, 93(8), 1197-1208.
- [115] BACOLLA, A., J. R. COLLINS, B. GOLD, et al. Long homopurine*homopyrimidine sequences are characteristic of genes expressed in brain and the pseudoautosomal region. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34(9), 2663-2675.
- [116] LEE, Hui-Ting, Irine KHUTSISHVILI, Luis A. MARKY, et al. DNA Complexes Containing Joined Triplex and Duplex Motifs: Melting Behavior of Intramolecular and Bimolecular Complexes with Similar Sequences. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, 114(1), 541-548.
- [117] OLIVEIRA, Pedro H, Duarte PRAZERES a Gabriel MONTEIRO. DNA instability in bacterial genomes: causes and consequences. *Genome Analysis: Current Procedures and Applications*. 2014, 14(1), 261-284

- [118] GELLERT, M., M. N. LIPSETT a D. R. DAVIES. HELIX FORMATION BY GUANYLIC ACID. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1962, 48(12), 2013-2018.
- [119] ZIMMERMAN, Steven B., Gerson H. COHEN a David R. DAVIES. X-ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid. *Journal of Molecular Biology*. 1975, 92(2), 181-192.
- [120] BURGE, Sarah, Gary N. PARKINSON, Pascale HAZEL, Alan K. TODD a Stephen NEIDLE. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*. 2006, 34(19), 5402-5415.
- [121] FRIED, Michael a Donald M. CROTHERS. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 1981, 9(23), 6505-6525.
- [122] HELLMAN, Lance M a Michael G FRIED. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*. 2007, 2(8), 1849-1861.
- [123] BINNIG, G., C. F. QUATE a Ch. GERBER. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*. 1986, 56(9), 930-933.
- [124] BUSTAMANTE, Carlos, James VESENKA, Chun Lin TANG, William REES, Martin GUTHOLD a Rebecca KELLER. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy. *Biochemistry*. 2002, 31(1), 22-26.
- [125] BECKWITT, Emily C., Muwen KONG a Bennett VAN HOUTEN. Studying protein-DNA interactions using atomic force microscopy. 2018, 73, 220-230.
- [126] ZHONG, Q., D. INNISS, K. KJOLLER a V.B. ELINGS. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science*. 1993, 290(1-2), L688-L692.
- [127] UENTES-PEREZ, Maria Eugenia, Mark S. DILLINGHAM a Fernando MORENO-HERRERO. AFM volumetric methods for the characterization of proteins and nucleic acids. *Methods*. 2013, 60(2), 113-121.
- [128] HINTERMANN, G., H.-M. FISCHER, R. CRAMERI a R. HÜTTER. Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid*. 1981, 5(3), 371-373.
- [129] LUO, Dan, Yougen LI, Soong Ho UM a Yen CU. A Dendrimer-Like DNA-Based Vector for DNA Delivery: A Viral and Nonviral Hybrid Approach. *DNA Vaccines*. New Jersey: Humana Press, 2006, 5(3), 115-126.
- [130] SRINIVASAN, Charudharshini, Jeunghoon LEE, Fotios PAPADIMITRAKOPOULOS, Lawrence K. SILBART, Minhua ZHAO a Diane J. BURGESS. Labeling and Intracellular Tracking of Functionally Active Plasmid DNA with Semiconductor Quantum Dots. *Molecular Therapy*. 2006, 14(2), 192-201.
- [131] PORUBIAKOVÁ, Otilia, Natália BOHÁLOVÁ, Alberto INGA, Natália VADOVIČOVÁ, Jan COUFAL, Miroslav FOJTA a Václav BRÁZDA. The Influence of Quadruplex Structure in Proximity to P53 Target Sequences on the Transactivation Potential of P53 Alpha Isoforms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(1).

7 SKRATKY A SYMBOLY

AFM	Mikroskopia atomárných síl
AMK	Aminokyselina
AMP	Ampicilín
APS	Peroxodisíran amónny
ATB	Antibiotikum
bp	Páry bazí
CAM	Chloramfenikol
CD	Cirkulárny dichroizmus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Kyselina etyléndiamíntetraoctová
EMSA	Gélová retardačná analýza
GOF	Zisk nových proteínových funkcií
IDP	Proteín s narušenou vnútornou štruktúrou
kb	kilobazí
kDa	kilodalton
LEU	Leucín
mutp53	Mutantný proteín p53
NC	Nitrocelulóza
PEG	Polyetylénglykol
PRD	Oblasť bohatá na prolín
RE	Responzívny element
SDS	Dodecylsírán sodný
TAD	Transaktivačná doména
TEMED	N, N, N, N-Tetrametyletyléndiamín
TP	Transaktivačný potenciál
TRP	Tryptofán
wtp53	Pôvodný nemutovaný proteín p53