



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM INTERAKCÍ MUTANTNÍCH FOREM NÁDOROVÉHO SUPRESORU P53 S RŮZNÝMI DNA STRUKTURNÍMI MOTIVY

STUDY OF INTERACTIONS BETWEEN MUTANT FORMS OF THE P53 TUMOR SUPPRESSOR AND
VARIOUS DNA STRUCTURAL MOTIFS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Blanka Sitková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2026

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2091/2024 Akademický rok: 2025/26
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Blanka Sitková**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **prof. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium interakcí mutantních forem nádorového supresoru p53 s různými DNA strukturními motivy

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše k zadanému tématu.

Izolace a purifikace proteinu p53 standardního typu a jeho mutovaných forem.

Studium interakcí proteinu p53 standardního typu a jeho mutovaných forem in vitro prostřednictvím mikroskopie atomárních sil (AFM) a elektroforetických testů posunu mobility (EMSA).

Studium transkripční aktivity mutantních proteinů p53 in situ v jednohybridním kvasinkovém isogenním systému.

Termín odevzdání diplomové práce: 4.5.2026

Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Blanka Sitková
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2026

prof. Ing. Stanislav Obruča,
Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Protein p53 patří mezi nejstudovanější proteiny a je mutován ve více než 50 % případů nádorového bujení u lidských buněk. Tyto mutace mohou vést ke změnám jeho funkce, a to jak ztrátou, tak i získáním nových vlastností, které následně ovlivňují buněčné procesy. Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na studium proteinu p53 a jeho mutantních variant R175H a R273H z hlediska jejich interakcí s nekanonickými strukturami DNA, zejména G-kvadruplexy a křížovými strukturami. Bylo prokázáno, že jak nemutovaná, tak mutantní forma p53 je schopna se na tyto struktury vázat. Pomocí mikroskopie atomárních sil bylo dále zjištěno, že C-terminální doména ovlivňuje vazbu proteinu k těmto strukturám DNA. Transkripční aktivita vybraných mutantních proteinů byla analyzována pomocí luciferázových reportérových testů. V podmínkách *in vitro*, v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, nebyly pozorovány významné změny v transkripční aktivitě sledovaných proteinů.

KLÍČOVÁ SLOVA

p53, G-kvadruplexy, vazebné vlastnosti, mutp53, EMSA, AFM, transkripční aktivity mutp53

ABSTRACT

The p53 protein is one of the most extensively studied proteins and is mutated in more than 50 % of human cancer diseases. These mutations can alter its function, leading to both loss and gain of function, which subsequently affects various cellular processes. The experimental part of this thesis focuses on the study of the p53 protein and its mutant variants R175H and R273H in terms of their interactions with non-canonical DNA structures, particularly G-quadruplexes and cruciform structures. It was demonstrated that both the wild-type and mutant forms of p53 are capable of binding to these structures. Atomic force microscopy further revealed that the C-terminal domain influences the binding of p53 to the studied DNA structures. The transcriptional activity of selected mutant proteins was analyzed using luciferase reporter assays. Under *in vitro* conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, no significant changes in transcriptional activity of the studied proteins were observed.

KEYWORDS

p53, G-quadruplex, binding properties, mutp53, EMSA, AFM, transcriptional activities of mutp53

SITKOVÁ, Blanka. *Studium interakcí mutantních forem nádorového supresoru p53 s různými DNA strukturními motivy*. Online, diplomová práce. Václav BRÁZDA (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2026. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156578>. [cit. 2026-04-19].

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat panu prof. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za možnost vypracovat svou diplomovou práci pod jeho vedením a paní Ing. Libuši Kratochvilové za konzultaci a čas, který mi věnovala při vypracování této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	G-kvadruplexy	8
2.1.1	Struktura G-kvadruplexů	8
2.1.2	Výskyt G-kvadruplexů v lidském genomu	9
2.1.3	G-kvadruplexy přítomné v telomerách	10
2.1.4	G-kvadruplexy přítomné v promotorech onkogenů	10
2.1.5	G-kvadruplexy přítomné v dalších regulačních oblastech genomu	11
2.1.6	Biologické funkce G-kvadruplexů	12
2.2	Křížové struktury	12
2.3	Protein p53	14
2.3.1	Struktura proteinu p53	14
2.3.2	Biologické funkce proteinu p53	15
2.3.3	Mutace proteinu p53	16
2.3.4	Vazebné vlastnosti proteinu p53	17
3	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1	Materiály	20
4.1.1	Mikrobiologické kmeny	20
4.1.2	DNA	20
4.1.3	Antibiotika a protilátky	21
4.1.4	Chemikálie	21
4.1.5	Přístrojové vybavení	22
4.2	Složení médií a dalších použitých roztoků	23
4.3	Metody	25
4.3.1	Transformace bakterií	25
4.3.2	Izolace proteinů proteinovou afinitní chromatografií	25
4.3.3	Western blot	26
4.3.4	Hybridizace oligonukleotidů	27
4.3.5	Elektroforetické testy posunu mobility (EMSA)	28
4.3.6	Mikroskopie atomárních sil (AFM)	28
4.3.7	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	28
4.3.8	Přečistění DNA po PCR	29
4.3.9	Transformace kvasinkových kultur lithium-acetátovou metodou	29
4.3.10	Luciferázové reportérové testy	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
5.1	Izolace a charakterizace proteinů	31
5.2	Elektroforetické testy posunu mobility	35
5.3	Mikroskopie atomárních sil	38
5.4	Luciferázové reportérové testy	41
6	ZÁVĚR	46
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	47
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	60

1 ÚVOD

Protein p53, často populárně označovaný jako „strážce genomu“, je jedním z nejčastěji mutovaných proteinů u nádorových onemocnění, je studován více než 40 let. Je kódován genem *TP53*, který patří mezi tzv. nádorově supresorové geny [1, 2]. Protein p53 funguje jako transkripční faktor. Hraje klíčovou roli v reakci na poškození genomu. Za normálních okolností se protein p53 v buňce vyskytuje v malém množství, pokud ovšem dojde k nějakému poškození DNA, jeho hladina začne stoupat. Jeho aktivaci může vyvolat např. UV záření nebo chyby během replikace DNA, pokud je správně aktivní, zastavuje buněčný cyklus (typicky v G1 a S1 fázi), čímž dává možnost buňce se opravit, zároveň aktivuje geny podílející se na mechanismech opravy [3]. Pokud ovšem oprava již není možná, iniciuje apoptózu, eventuálně může spustit proces senescence, kdy je buňka metabolicky aktivní, ale již se nemůže dále dělit. Hladina proteinu p53 je přísně regulována pomocí jeho negativního regulátoru MDM2, který iniciuje jeho odbourávání a p53 naopak stimuluje jeho tvorbu. V případě narušení biologických funkcí proteinu p53 dochází k mutacím v genomech, které mohou vést až k rozvoji nádorových onemocnění [4].

Protein p53 je schopen rozpoznávat sekundární struktury DNA, jako jsou např. křížové struktury, nebo struktury G-kvadruplexů, které jsou hojně přítomny v genomu v oblastech, jako jsou např. promotory genů [5]. Bylo prokázáno, že jak protein standardního typu, tak mutanti proteinu p53, jako např. R175H nebo R273H, jsou schopni se na sekundární struktury G-kvadruplexů vázat, a v některých případech je dokonce stabilizovat, což může mít vliv na regulační mechanismy v genomu [6]. Navíc bylo prokázáno, že protein p53 se může vázat na sekvence s potenciálem tvorby křížových struktur, které se v genomu taktéž podílejí na regulaci řady významných funkcí [7].

V této diplomové práci jsou sledovány rozdílné vazebné vlastnosti tří vybraných proteinů rodiny p53 – proteinu standardního typu a mutovaných proteinů R175H a R273H, k různým sekundárním strukturám DNA (dsDNA, křížová struktura a G-kvadruplex) za účelem studia jeho vazebných vlastností. Následně byl sledován vliv vazby vybraných proteinů k různým sekundárním strukturám na biologickou aktivitu proteinů v isogenním systému modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 G-kvadruplexy

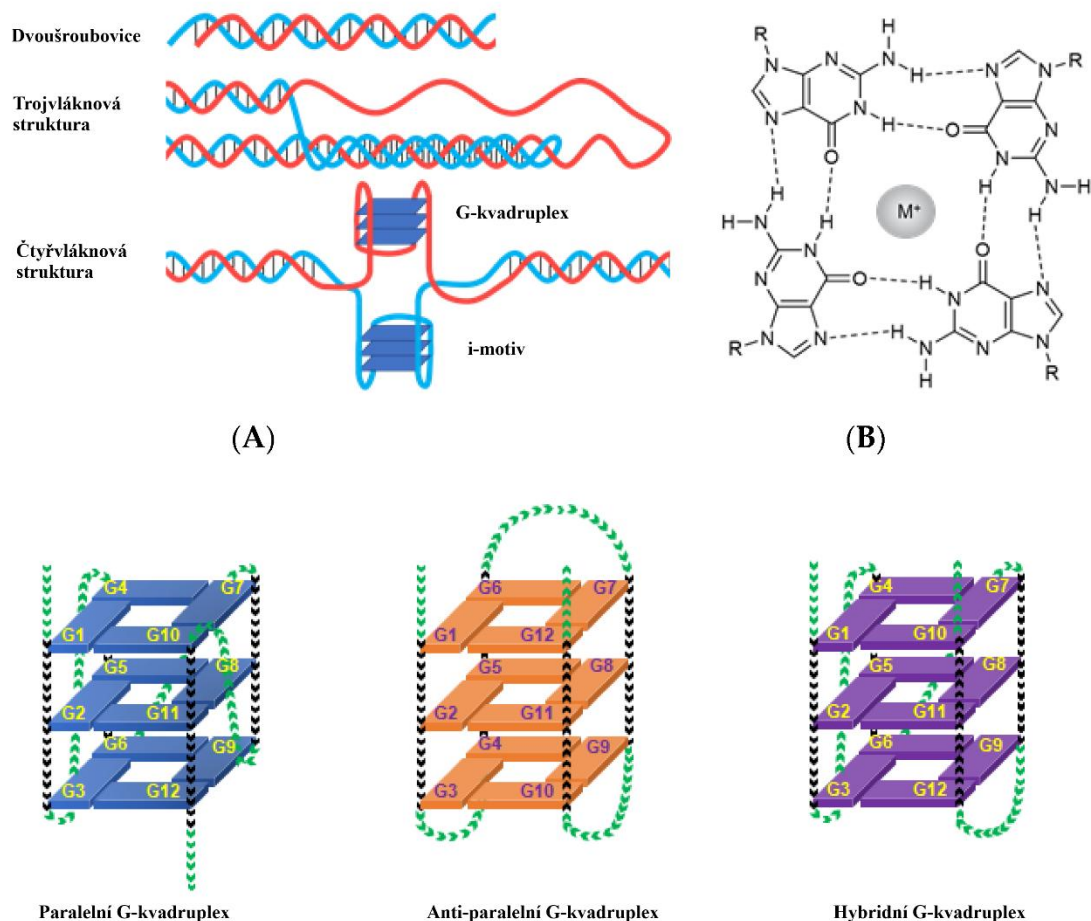
V genomu řady organismů je sekundární struktura DNA nejčastěji popisována jako pravotočivá dvoušroubovice B-DNA. Nicméně v minulosti byly popsány, kromě dobře známých forem DNA (A-DNA, B-DNA a Z-DNA), i sekundární lokální struktury, jako jsou křížové struktury, triplexní DNA, nebo kvadruplexy. Původně byly tyto struktury označovány jako neobvyklé, ale později bylo prokázáno, že tyto lokální struktury se nacházejí ve všech organismech a ovlivňují celou řadu biologických funkcí. Kromě toho vazba některých proteinů na nadšroubovicové vinutí DNA může podporovat vznik a zvyšovat stabilitu konformace těchto struktur [8–11]. Na konci 80. let biochemické experimenty prokázaly, že oligonukleotidy, které obsahují oblasti se zvýšeným výskytem sousedících guaninů, se spontánně skládají do útvarů označovaných jako guaninové kvadruplexy (G-kvadruplexy, G4s; z angl. G-quadruplexes). První důkaz přítomnosti struktur G-kvadruplexů v rámci genomu byl prokázán na eukaryotních telomerách, později byl potvrzen jejich výskyt i v oblasti promotorů genů [12–14]. G-kvadruplexy se nacházejí ve většině organismů – byly nalezeny jak u jednoděložných, tak i dvouděložných rostlin, kvasinek, bakterií, hmyzu, virů a samozřejmě savců [15, 16]. G-kvadruplexy patří mezi nejvýznamnější nekanonické sekundární struktury nukleových kyselin a hrají důležitou roli v regulaci genových procesů jako jsou transkripce, translace, polyadenylace, nebo interakce s proteinovými faktory [17].

2.1.1 Struktura G-kvadruplexů

K formování G-kvadruplexů dochází v důsledku interakcí guaninových bází spojených vodíkovými můstky dle pravidel tzv. Hoogsteenova párování. Struktury G-kvadruplexů jsou tvořeny dvěma a více planárními G-kvartety, pro něž se používá výraz G-tetrády. Když se tyto G-kvartety uspořádají nad sebe může vzniknout struktura G-kvadruplexu, která je stabilizována v prostředí obsahující jednomocné kationty jako jsou draselné či sodné ionty. Díky dnešním zobrazovacím technikám již víme, že G-kvadruplexy mají vysokou strukturální variabilitu, tzv. polymorfismus, a lze je tudíž charakterizovat dle počtu či orientace vláken [18, 19].

Obecně je možné dělit struktury G4 na základě počtu vláken nukleových kyselin, kterými jsou tvořeny a dle směru vedení vláken. Na základě dělení vycházející z počtu vláken DNA (eventuelně RNA), které dávají vzniknout struktuře G-kvadruplexu, lze rozdělit G4 na jednořetězcové (unimolekulární), dvouřetězcové (bimolekulární), třířetězcové (trimolekulární), nebo čtyřřetězcové (tetramolekulární). V každém G-kvadruplexu se nacházejí čtyři vlákna, která mohou být vůči sobě v paralelním, nebo anti-paralelním uspořádání, což je dáno konformací glykosidického torzního úhlu guaninů. Na základě vzájemného vedení všech vláken poté rozlišujeme konformaci G-kvadruplexů jako paralelní, antiparalelní, nebo hybridní (viz. **Obrázek 2.1**). Paralelní konformace znamená, že všechny řetězce jsou orientovány stejným směrem, antiparalelní konformace je dána tak, že dva řetězce ze čtyř jdou opačným směrem a hybridní uspořádání znamená, že jeden ze tří řetězců běží opačným směrem než zbývající tři. Zbývající části sekvence, která propojuje G-tetrády seskládané do G-kvadruplexů, se nazývají smyčky [20, 21].

Smyčky, přítomné ve strukturách G-kvadruplexů, mohou být označovány jako externí, laterální nebo diagonální. Zatímco externí smyčka spojuje sousední paralelně orientovaná vlákna, laterální smyčka (neboli boční smyčka) spojuje dvě sousední vlákna v anti-paralelním uspořádání. Posledním typem je tzv. diagonální smyčka, která spojuje dvě diagonálně umístěná vlákna v anti-paralelním uspořádání. [22, 23].



Obrázek 2.1: Struktura G-kvadruplexů. Vznik G-kvadruplexu na dvoušroubovici (A) a pospojování guaninů pomocí vodíkových můstků v rámci jedné G-tetrády s jednomocným kationtem (B). V dolní části jsou schematicky zobrazeny různé konformace G-kvadruplexů. Převzato a upraveno [24].

2.1.2 Výskyt G-kvadruplexů v lidském genomu

Sekundární struktury G-kvadruplexů v lidském genomu plní důležitou roli při kontrole genů a přirozené regulaci jejich exprese. Jak bylo uvedeno výše, G-kvadruplexy se mohou tvořit v nukleotidových oblastech bohatých na guanin, přičemž dosud nejvíce studovaným místem výskytu G4 jsou telomery, kde mohou formovat více odlišných intramolekulárních kvadruplexů. G-kvadruplexy se ovšem mohou tvořit i na dalších místech lidského genomu, jako jsou např. promotory genů, nebo nekódující oblasti genů. Dosavadní výsledky studií naznačují možné využití v klinických aplikacích. Příkladem může být možnost využití cílení

G-kvadruplexů *in vivo* pro širokospektrální protinádorovou terapii [25–28]. Výskyt G-kvadruplexů v lidském genomu je uváděn na jeden G-kvadruplex na 10 000 pb [29].

2.1.3 G-kvadruplexy přítomné v telomerách

Telomery (*z řečtiny telos* – konec a *meros* – část) jsou specializované koncové části jaderných chromozomů DNA, které jsou lokalizované na konci eukaryotických chromozomů. U lidí a dalších obratlovců se telomerická DNA skládá z tandemově se opakujících sekvencí (TTAGGG)_n o délce 3–15 kilobází a 150–200 nukleotidů dlouhého jedno-řetězcového přesahu na 3' vlákně, přičemž telomerická repetice vykazuje schopnost tvorby G-kvadruplexových struktur [30, 31].

S každou replikací dochází ke zkrácení telomer o 50–200 bází, přičemž v okamžiku, kdy dosáhnou kritického zkrácení, nastane programovaná buněčná smrt (apoptóza). Výjimku tvoří pouze vysoce proliferující buňky, jako např. buňky kmenové, či nádorové, kde jsou telomery obnovovány pomocí enzymu telomerázy [32, 33]. Bylo dokázáno, že G-kvadruplexy tvořící se v lidských telomerních oblastech stabilizující DNA, jsou schopny inhibovat aktivitu telomerázy [34]. I když telomery vyšších eukaryot postrádají sekvenční diverzitu, v případě telomerních G-kvadruplexů byl prokázán strukturální polymorfismus, jak bylo popsáno výše [35, 36]. Kromě toho, díky přesahujícímu jedno-řetězcovému konci, může docházet k tvorbě G-kvadruplexů, aniž by byla narušena tvorba komplementárního vlákna [37].

Ačkoli jsou struktury G-kvadruplexů teplotně stabilní, trvalo několik desetiletí, než byl prokázán jejich přirozený výskyt *in vivo*. G-kvadruplexy v lidském genomu jsou taktéž spojeny s rozvojem řady onemocnění. Bylo prokázáno, že nezanedbatelné množství lidských nemocí je způsobeno změnou v tvorbě telomer, což vede k předpokladu, že oprava chybných procesů při tvorbě G-kvadruplexů v telomerách může hrát důležitou roli při léčbě těchto onemocnění [38, 39]. Byla identifikována řada proteinů a ligandů, které interagují s telomerickými G-kvadruplexy, které by mohly v budoucnu být využity právě ke konkrétnímu terapeutickému využití [40].

2.1.4 G-kvadruplexy přítomné v promotorech onkogenů

Jak bylo zmíněno výše, G-kvadruplexy se tvoří taktéž v řadě klíčových promotorů onkogenů a působí jako transkripční regulátory. Bylo zjištěno, že oblasti promotorů obsahují četnější výskyt G-kvadruplexů ve srovnání se zbytkem genomu. Zda se jedná o regulaci negativní, či pozitivní, zatím nebylo plně objasněno. Na rozdíl od G-kvadruplexů nacházejících se v telomerách, nejsou sekvence s potenciálem tvorby G4 v oblastech promotorů charakterizovány konkrétní tandemovou repeticí a mohou být tvořeny různými sledy nukleotidů, pokud obsahují dostatečné množství G-běhů, tedy sousedících sekvencí guaninů [29, 41, 42]. G-kvadruplexy přítomny v promotorech onkogenů se jeví jako slibné cíle při vývoji nových terapeutik určených pro léčbu onkologických onemocnění, díky potenciální schopnosti represe transkripce těchto onkogenů [43].

Mezi oblasti genových promotorů typických pro výskyt G-kvadruplexů patří, mimo jiné geny *c-MYC* (kuřecí homologní virový onkogen z ptačí myelocytomatózy z rodiny MC29;

z angl. chicken homologous of the avian myelocytomatosis virus MC29) [44], *c-KIT* (tyrosinkinázový receptor KIT), *KRAS* (virový onkogen Kirsten krysího sarkomu; z angl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene) [45], *BCI-2* (lymfom B-buněk 2; z angl. B-cell lymphoma 2), *VEGF* (cévní endoteliální růstový faktor, z angl. the human vascular endothelial growth factor), *HIF1A* (hypoxií indukovatelný faktor, z angl. Hypoxia-inducible factors HIF1 α) [46], *c-MYB* (transkripční faktor z rodiny proteinů MYB), aj.[47, 48]. Onkogen *c-MYC* je významným transkripčním faktorem, regulující geny zapojené do proliferace, diferenciace a apoptózy. Sekvence jeho promotoru je bohatá na výskyt guaninů, která tvoří rodinu stabilních G-kvadruplexů, které jsou dosud nejlépe prozkoumány ze všech G-kvadruplexů přítomných v onkogenech [49–51]. G-kvadruplexy přítomny v promotorovém onkogenu *c-MYC*, k jehož nadměrné expresi dochází až u 80 % nádorů, působí jako tzv. represory, které inhibují expresi proteinu c-MYC [48, 52]. Vliv G-kvadruplexů na rychlost transkripce *in vivo* nebyl prokázán pouze v případě lidského genu *c-MYC*, nýbrž i v případě exprese dalších genů, včetně kuřecího β -globulinu [29].

2.1.5 G-kvadruplexy přítomné v dalších regulačních oblastech genomu

G-kvadruplexy jsou hojně zastoupeny i v dalších oblastech genomu, kde se mohou podílet na řízení klíčových buněčných procesů. Přítomnost G-kvadruplexů byla již potvrzena v oblastech počátku replikace, kde jsou umístěny před iniciačním místem syntézy DNA, přičemž, pokud byla provedena delece těchto sekvencí, došlo k výraznému snížení aktivity počátku replikace a naopak, pokud byla provedena inserce v místě, kde nebyly počátky replikace lokalizovány, došlo k vytvoření nových aktivních počátků replikace [53].

Pomocí kompetitivních pokusů bylo taktéž prokázáno, že sekvence schopná tvořit G-kvadruplexy *in vitro* výrazně ovlivňují iniciaci replikace DNA [54]. G-kvadruplexy se nacházejí uvnitř i v blízkém okolí UTR (nepřekládaná oblast; z angl. untranslated region) mRNA, jak bylo prokázáno v 3' UTR mRNA inzulinu podobnému růstového faktoru IGF-II, kde se G-kvadruplexy nachází za místem endonukleotického štěpení. G-kvadruplexy byly dále objeveny v oblasti 5' UTR transkriptu, kde mohou ovlivňovat stabilitu mRNA a efektivitu translace [55]. G-kvadruplexy se nacházejí také v intronových oblastech genomu, kde mohou regulovat alternativní sestřih tím, že mění lokální konformaci nukleové kyseliny a upravují vazbu RNA-vazebných proteinů podílejících se na sestřihu. Např. u genu *TP53* (z angl. tumor protein) kódujícího protein p53 bylo doloženo, že G-kvadruplexy v intronových oblastech ovlivňují sestřih pre-mRNA a vedou tak ke vzniku různých izoforem p53, které vykazují odlišné biologické funkce [56].

Kromě vlivu G-kvadruplexů na buněčné funkce, který je daný samotnou přítomností G4 struktur, byl prokázán i vliv daný interakcí G-kvadruplexů s různými proteiny, mezi které patří, mimo jiné helikázy, telomerové vazebné proteiny, epigenetické modulátory a transkripční faktory [57]. Struktury G-kvadruplexů nacházející se v oblastech označovaných jako tzv. *enhancery* (zesilovače) transkripce mohou vázat více transkripčních faktorů, a tak vykazovat vyšší transkripční aktivitu [58].

2.1.6 Biologické funkce G-kvadruplexů

Pomocí výpočetních technik a sekvenčních databází bylo zjištěno, že existuje minimálně 300 000 sekvencí s potenciálem tvorby G-kvadruplexu v lidském genomu. Je důležité zdůraznit, že G-kvadruplexy se v genomu nenacházejí ledabyle, většina se nachází ve funkčních oblastech a jejich pozice jsou mezi druhy vysoce konzervované což značí, že existuje vysoký selekční tlak na zachování těchto sekvencí, přičemž nejvíce byla lokalizace struktur G-kvadruplexů zachována mezi savci [59–61].

Struktury G-kvadruplexů se podílejí mimo jiné, na regulaci transkripce a replikace genomu, udržování telomer a epigenetické regulaci a rekombinaci [62, 63]. V případě transkripce mohou fungovat jako vazebné místo pro iniciační transkripční faktory, nebo mohou ovlivňovat aktivitu RNA polymerázy, přičemž vždy záleží na tom, kde se v průběhu transkripce zformované struktury G-kvadruplexů nacházejí, což může vést k pozitivnímu, resp. negativnímu ovlivnění transkripce. V některých případech se transkripční faktory preferenčně váží na struktury G4 oproti běžné B-formě dsDNA. V sekvencích promotorů, které jsou bohaté na guaniny (jako jsou geny *c-MYC* a *Bcl-2*) bylo prokázáno, že vzniká více G4 struktur, jež zde fungují jako represory transkripce [64, 65]. G-kvadruplexy mohou blokovat, nebo zpomalovat replikaci DNA vedoucího řetězce během syntézy. G-kvadruplexy jsou formovatelné struktury a poslední studie naznačují, že replikační aparát je schopen je detekovat a rozplétat ještě před nástupem replikační vidličky. Mechanismy detekce a rozplétání G4 jsou zprostředkovány specifickými proteiny, navíc existuje podezření, že mechanismy uplatňující se při rozplétání G4 fungují i při dalších buněčných procesech nesouvisejících s replikací [63]. Absence některých helikáz, jako např. replikačně asociované helikázy FANCF (protein komplementační skupiny J Fanconiho anémie; z angl. Fanconi anemia complementation group J [66]), vede k tomu, že nedochází k rozplétání G4 struktur, čímž dochází k narušení aktivity DNA polymerázy [67].

V případě telomer mají G-kvadruplexy dvojí roli, buď chrání integritu telomer tím, že přispívají k jejich strukturní stabilitě, anebo regulují jejich délku. Regulace délky telomer probíhá přímo inhibicí vazby telomerázy na telomerické sekvence, nebo změnou rychlosti disociace telomerických primerů od telomerázy, čímž je zabráněno nadměrné proliferaci buněk [68–70]. G-kvadruplexy se v rámci euchromatinu vyskytují v guaninových sekvencích, kde se překrývají s epigenetickými markery, především s acetylací histonu H3K9. I když se zatím nejeví, že by G4 představovaly epigenetickou modifikaci v klasickém slova smyslu, jejich přítomnost v transkripčně aktivních místech a specifická subnukleární lokalizace naznačuje, že fungují jako konformační prvky podílející se na epigenetické regulaci [71].

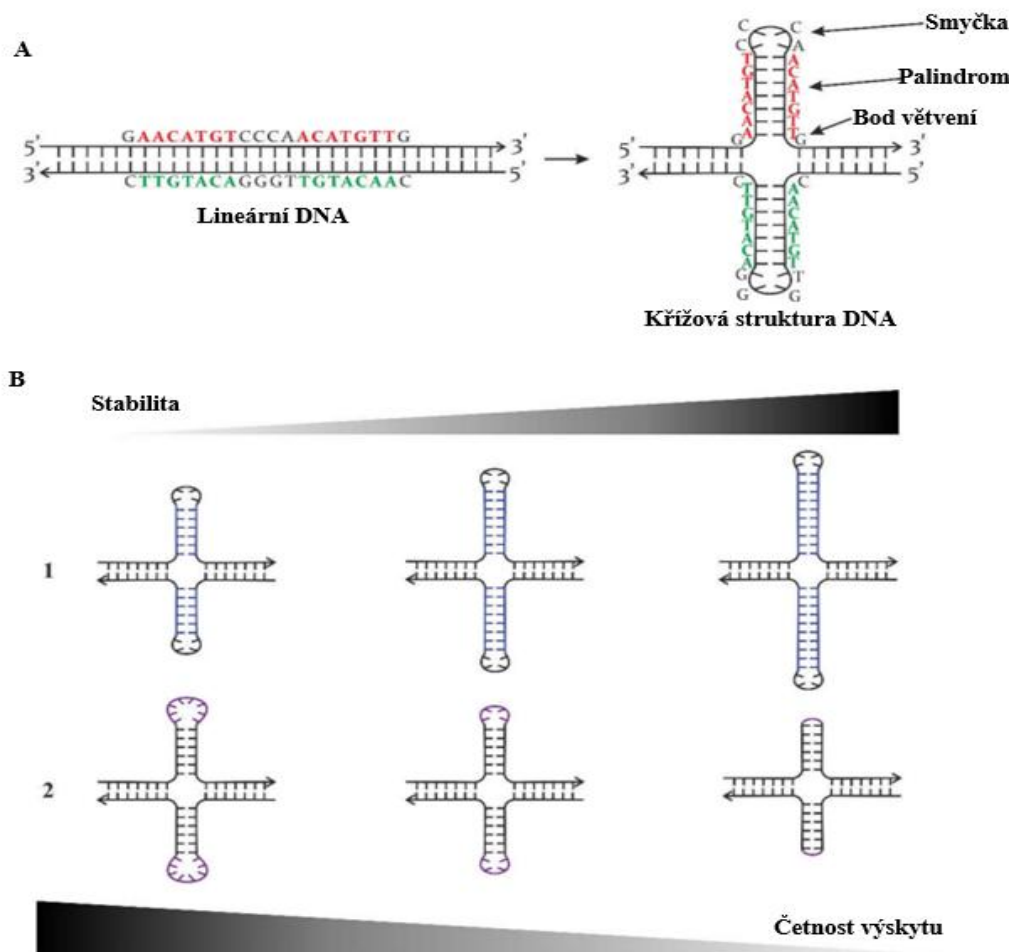
2.2 Křížové struktury

Křížové (z angl. cruciform) struktury DNA vznikají z palindromatických sekvencích dsDNA, kdy se na vláknech vytvoří vlásenkové struktury (z angl. hairpin) – viz. Obrázek 2.2. Každá vlásenka se skládá z párové oblasti tvořené komplementárními inverzními repeticemi a smyčkami [72]. Jejich stabilita je zvýšena pomocí nadšroubovicového vinutí DNA, přesto jsou za normálních podmínek termodynamicky méně stabilní než B-DNA [73]. Oblasti obsahující inverzní repetice schopné tvořit křížové struktury jsou často spojovány se zvýšeným

výskytem mutací nebo delecí, protože mohou být chybně rozpoznávány replikačními, či opravnými mechanismy [74].

Významné jsou především jako regulační a strukturální prvky, protože mění prostorové uspořádání DNA, což může ovlivňovat enzymy zapojené do replikace či vazbu proteinu, např. transkripčních faktorů. V určitých případech mohou tyto struktury přispívat k regulaci iniciačních míst replikace a sloužit jako substráty pro specifické nukleázy [75, 76].

Cílové sekvence proteinu p53, schopné vytvářet křížové struktury, vykazují zvýšenou afinitu p53 k DNA, přičemž sekvencně specifická vazba je zásadní pro jeho funkci. Tyto sekvence, tvořené dvěma kopiemi motivu 5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3' (kde R je purin, Y je pyrimidin, G je guanin, T thymin a A adenin), mají často charakter inverzních repetic a mohou vytvářet sekundární struktury DNA. Bylo prokázáno *in vivo*, že vazba p53 na jeho cílovou sekvenci je silně závislá na přítomnosti inverzních repetic. Tyto poznatky naznačují, že kromě samotné nukleotidové sekvence, hraje důležitou roli i prostorové uspořádání DNA, které může ovlivňovat regulaci genů řízených proteinem p53 [77].



Obrázek 2.2: *Struktura křížových struktur DNA s příkladem palindromické sekvence. Část A zobrazuje přechod inverzní repetice z lineární konformace do vlásenky/křížové struktury. V části B jsou fialově označeny smyčky, modře palindromické sekvence. U všech schematických nákrešů šipka označuje 3' konec řetězce DNA. Převzato a upraveno [78].*

2.3 Protein p53

Protein p53 je kódován genem *TP53*, umístěným na krátkém raménku chromozomu 17. Protein p53 plné délky je tvořen 393 aminokyselinami a dosahuje přibližné molekulové hmotnosti 53 000 Da. První zmínky o proteinu p53 spadají již do roku 1979. Zprvu byl gen *TP53* považován za protoonkogen, později bylo prokázáno, že se jedná o nádorově-supresorový gen [1].

Jaderný protein p53 je důležitý transkripční faktor a jako nádorový supresor zaujímá ústřední postavení v reakci na poškození DNA [3]. Protein p53 standardního (divokého) typu zabraňuje replikaci poškozené DNA a udržuje celistvost genomu. V případě vystavení buněk buněčnému stresu indukuje protein p53 aktivaci řady biologických reakcí vedoucích k zastavení buněčného cyklu a opravě poškozené DNA, buněčné senescenci či programované buněčné smrti (apoptóze) [4].

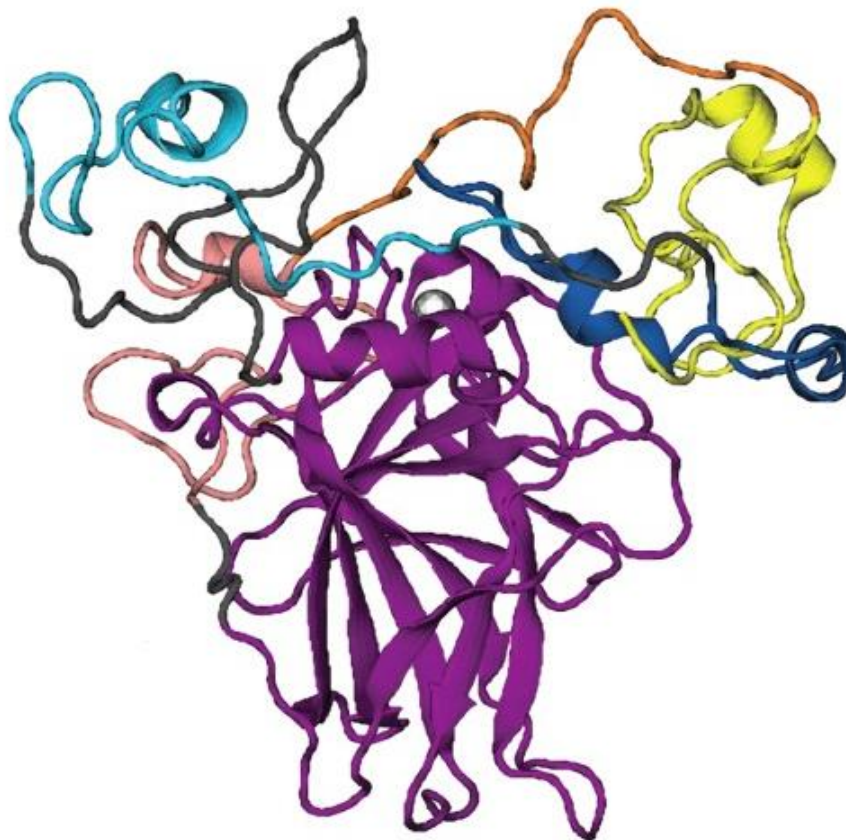
Mutace genu *TP53* může vést k inaktivaci proteinu p53 standardního typu, což následně vede ke genomické nestabilitě a může mít za následek vznik rakoviny [79]. Některé mutované proteiny p53 dokonce vykazují získání nových funkcí GOF (z angl. gain of function), které podporují tumorigenezi. Velká část nádorů vykazuje narušení přirozených drah proteinu p53. Protein p53 vykazující ztrátu aktivity je náchylnější k rozkladu a agregaci, či k tvorbě amyloidních agregátů [80, 81]. Díky své významné roli v procesech potlačující vznik nádoru se protein p53 jeví jako slibný potenciální cíl při vývoji nových přístupů k léčbě nádorových onemocnění [82].

Lidský protein p53 spadá do rodiny proteinů p53, do které náleží rovněž jeho strukturní a funkční homology p73 a p63. Rodina proteinů p53 sdílí podobné proteinové domény, jako jsou např. transaktivační doména (TAD; z angl. transactivation domain), DNA vazebná doména (DBD; z angl. DNA-binding domain) nebo oligomerizační doména (OD; z angl. oligomerization domain), jejichž délka je u jednotlivých členů rodiny p53 mírně odlišná. Důvod, proč se výzkum rakoviny zaměřuje převážně na protein p53, je jeho ojedinělý výskyt mutací oproti proteinům p63 a p73 spojených s progresí rakoviny – proteiny p63 a p73 vykazují spíše sklon k vývojovým vadám [2, 83].

2.3.1 Struktura proteinu p53

Protein p53 je tvořen třemi oblastmi N-terminální a C-terminální koncové domény a centrální DNA-vazebná doména. N-terminální oblast zahrnuje dvě transaktivační domény (TADI a TADII) a doménu bohatou na prolin tvořenou aminokyselinami 1–93. Aminokyseliny 102–292 tvoří DBD doménu označovanou rovněž v některých případech jako CD (jádrová doména, z angl. core domain). C-terminální oblast proteinu p53 (aminokyseliny 323–393) tvoří oligomerizační (tetramerizační) doménu a CTD (C-terminální regulační doména; z angl. C-terminal regulatory domain) [84–86]. Více než 40 % p53 je vnitřně neuspořádané, a to včetně TAD a CTD (viz. Obrázek 2.3). Díky této neuspořádanosti může p53 reagovat s řadou partnerů jako modulární protein [87]. N-terminální oblast v sobě zahrnuje TAD doménu, která je velmi kyselá a bohatá na prolin [88]. V této části se nacházejí TADI a TADII, které mohou vázat aktivátory a ko-aktivátory, čímž podpoří iniciaci transkripce a mohou též interagovat s negativními regulátory transkripce, které naopak potlačují její aktivaci [89].

Doména bohatá na prolin spojující domény TAD a DBD zajišťuje indukci zástavy buněčného cyklu nebo rovnou apoptózu buňky [90, 91].



Obrázek 2.3: *Struktura monomeru proteinu p53. Žlutě je znázorněna TADI, oranžově TADII, růžově je znázorněna doména bohatá na prolin, fialově je znázorněna DNA vazebná doména, šedě tetramerizační doména a modře C-terminální regulační doména. Převzato a upraveno [92].*

2.3.2 Biologické funkce proteinu p53

Za běžných podmínek se protein p53 nachází v jádře, kde se specificky váže na DNA a reguluje širokou škálu genů, přičemž jeho celková koncentrace v buňce je nízká a přísně regulována pomocí negativních regulátorů MDM2 a MDMX (z angl. mouse double minute), které jsou schopny indukovat degradaci proteinu p53 v důsledku ubiquitinace, kterou zprostředkovávají [93, 94].

Protein p53 hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, apoptózy, stárnutí buněk a metabolismu a často je mutován u karcinogenních onemocnění. Když jsou buňky vystaveny vnitřnímu nebo vnějšímu stresu, včetně poškození DNA, hypoxie, nedostatku živin nebo riziku vzniku nádorového bujení, ubikvitinace zprostředkovaná negativními regulátory proteinu p53 je inhibována, čímž se výrazně zvýší hladina p53 v buňce. Nahromaděný protein je aktivován a stabilizován posttranslačními modifikacemi, jako jsou fosforylace, acetylace, či methylace [95]. Aktivovaný protein poté reguluje transkripci cílových genů. Tyto funkce v buňce je schopen vykonávat nejen díky interakcím s dalšími proteiny, ale převážně vazbou na DNA [96].

Protein p53 může indukovat apoptózu buňky s poškozenou DNA pomocí transkripční aktivace exprese proapoptických genů mezi něž patří *PUMA* (modulátor apoptózy indukovaný proteinem p53, z angl. P53 up-regulated modulator of apoptosis [97]), *BAX* (proapoptický protein z rodiny Bcl-2, z angl. Bcl-2-associated X protein [98]) a *NOXA* (proapoptický protein z rodiny Bcl-2 z angl. phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1) [99]) [100–102]. Kromě toho může p53 interagovat s antiapoptickými proteiny Bcl-2 (z angl. B-cell leukemia/lymphoma-2, byly poprvé identifikovány s B-lymfocyty) Bcl-xl (extra velký B-lymfocyt, z angl. cell lymphoma-extra large) a Mcl-1 (protein 1 myelodní leukémie, z angl. myeloid cell leukemia-1) [103], čímž nepřímo indukuje apoptózu [104]. Kromě toho bylo zjištěno, že acetylace lysinu 120 zvyšuje specifitu vazby p53 k DNA a pravděpodobně se tak spolupodílí na regulaci jeho transkripční aktivity zejména ve vztahu k apoptóze [105].

Jedna ze základních funkcí proteinu p53 je také kontrola buněčného cyklu. Aktivovaný p53 indukuje expresi genu *CDKN1A*, kódujícího protein p21, což je inhibitor cyklin-dependetních kináz (CDK). Gen p21 inhibuje CDK, čímž dojde k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Kromě inhibice proteinů buněčného cyklu dále brání fosforylaci Rb (retinoblastomový protein, z angl. retinoblastoma tumor suppressor protein) pomocí komplexů cyklin D1-CDK4, cyklin D2-CDK4, cyklin E-CDK2. Nefosforylovaný Rb vytváří komplex s transkripčním faktorem E2F, což inhibuje aktivitu E2F a dojde ke zmíněné zástavě v G1 fázi. Při tomto zastavení může dojít k opravě poškozené DNA před vstupem do replikace, ovšem v případě absence p53 nebo při jeho mutaci buňka může dál pokračovat v dělení, a tudíž může dojít ke vzniku nádorového bujení [106, 107].

Poškození DNA spouští buněčnou senescenci, která pak aktivuje dráhy p53 jako odpověď na poškození. Mutace vedoucí k inaktivaci dráhy p53, která je klíčová pro průběh buněčné senescence, výrazně zvyšují šanci na vznik nádorů u myší. Bylo prokázáno, že aktivovaný p53 je schopen udržovat některé onkogenní sklony v klidovém stavu, a tím potlačovat další maligní vývoj, dokud je biologicky funkční. Tento případ nastává, pokud protein p53 není schopen vyvolat senescenci, nebo apoptózu [108, 109].

2.3.3 Mutace proteinu p53

Mutace proteinu p53 jsou dány mutacemi v kódujícím genu *TP53*. Mutace v *TP53* má většinou za následek změnu, nebo ztrátu vazebné aktivity p53 zhruba v 50 % lidských nádorů [110]. Gen *TP53* je neobvyklý, co se týče mutací, protože zřídka u něj dochází k delecím. Většina mutací u lidských nádorů (některé studie uvádí až 95 %) jsou tzv. *missense* mutace. Až 80 % všech mutací spojených s nádorovým bujením jsou mutace proteinu p53 lokalizovány

v centrální DNA-vazebné oblasti, která umožňuje rozpoznání specifických cílových sekvencí DNA označovaných jako responzivní elementy [111]. Většina zbývajících mutací spojená s nádorovým bujením vykazuje narušenou funkční dráhu p53, většinou se jedná o snížení koncentrace jaderného proteinu p53, což má za následek změny v odpovědích na stres buňky [112].

Místa v primární struktuře proteinu zvláště náchylná k mutacím jsou označována jako „hot spots“. U proteinu p53 existuje šest takových míst, které se nachází na tripletech 175, 245, 248, 249, 273 a 282. Mutace v těchto kodonech způsobují vznik proteinů se špatnou konformací, vedoucí následně ke ztrátě transkripční aktivity proteinu standardního („divokého typu“), nebo tvorbě proteinů s pozměněnou mitochondriální aktivitou [2]. Nejvyšší výskyt mutací připadá na mutace v kodonech 175 a 273, a to např. u mutací R175H a R273H, kde dochází k substituci arginu za histidin [113]. U myši, které exprimovaly mutanty p53 R172H nebo R270H (odpovídá lidským mutacím R175H a R273H) byl zaznamenán vyšší počet metastazovaných nádorů než u myši, kde protein p53 chyběl [114, 115]. Tyto „hot spots“ mutace se dělí do dvou základních kategorií, mutace způsobující konformační změny, např. u R175H a na tzv. kontaktní mutace, jako např. u R273H [116, 117]. V obou případech je narušena interakce DBD proteinu p53 se sekvencí responzivního elementu DNA, což má za následek poruchu regulace exprese cílových genů p53, které se zapojují do potlačení nádorového bujení. V nádorových buňkách se posléze hromadí velké množství mutovaných proteinů p53, poněvadž často nedochází k indukci exprese proteinu MDM2, který působí jako negativní regulátor p53 [118–120]. Mutanti p53 posléze ztrácejí antionkogenní funkci a navíc se u nich objevuje dominantně negativní efekt vůči standardní formě proteinu, což je stav, kdy mutované proteiny p53 vytváří heterodimery, které interagují s proteinem divokého typu a vytváří tak proteinové komplexy s pozměněnou transkripční aktivitou [121, 122]. Kromě samotné mutace *TP53* běžně dochází i k delecí zbylé nemutované alely *TP53* a k tzv. ztrátě heterozygotnosti LOH (z angl. loss of heterozygosity), poskytující nádorovým buňkám selekční výhodu [123]. Dle *in vivo* provedené studie je LOH u proteinu p53 nezbytná ke stabilizaci mutantních forem a k získání dalších onkogenních funkcí. Mutantní formy mohou díky LOH získat nové proonkogenní vlastnosti. Tento jev se označuje jako GOF. Jev byl pozorován u myších nádorů, kde docházelo ke ztrátě heterozygotnosti a rychlejšímu propuknutí nádoru. Oproti tomu u myších nádorů, kde nedocházelo ke ztrátě nezmutované alely, nedocházelo ke stabilizaci mutantních forem p53 a aktivita GOF nebyla prokázána [124].

2.3.4 Vazebné vlastnosti proteinu p53

Protein p53 je transkripční faktor, regulující velké množství genů, z nichž většina, kterou reguluje, obsahuje v promotorových oblastech responzivní elementy p53, kam se tetramery p53 vážou sekvencně specifickým způsobem. Responzivní elementy jsou tvořeny kanonickými konsenzuálními sekvencemi, které mívají délku zhruba 20 pb. Konsenzuální sekvence pro p53 není striktně vymezená, ale je tvořena dvěma opakujícími se dekamerními motivy 5'RRRCWWGYYY3' (kde R je purin, Y je pyrimidin a W je adeninová nebo thyminová báze), a tudíž se mezi jednotlivými regulovanými geny liší [125]. Většina vazebných míst pro p53 v lidském genomu jsou odděleny 0–13 pb *spacerem*, ovšem rozestup větší než 2 pb je vzácný [126]. Délka *spaceru* v DNA mezi dvěma dekamerními motivy je důležitým

faktorem ovlivňujícím vazbu p53 a jeho transkripční aktivitu. Vložení nukleotidů mezi tyto motivy vede ke snížení transkripcí [127].

Protein p53 váže konsenzuální sekvence DNA jako tetramer, který vzniká spojením dvou dimerů [128]. Primární dimery jsou stabilizovány prostřednictvím intramolekulárního antiparalelního uspořádání α -helixů a antiparalelního β -listu. Tyto dimery se poté seskládají do tetramerů prostřednictvím hydrofobních interakcí mezi helixy [129]. Oligomerizace p53 přispívá k jeho udržení v jádře, zatímco v neaktivní formě může volně přecházet do cytoplazmy [130]. V jádře mohou být přítomny všechny tři oligomerní stavy proteinu (monomery, dimery a tetamery). V případě, že dojde k poškození DNA dochází ke zrychlené tvorbě tetramerů (aktivní forma p53), a to dokonce dříve, než se zvýší samotná hladina proteinu. Což naznačuje, že tetramerický stav je ovlivňován dalšími faktory, jako jsou posttranslační modifikace a přítomnost kofaktorů [131].

DNA-vazebná doména vykazuje strukturu β -sendviče, na jehož povrchu se nacházejí dvě velké smyčky a motiv smyčka-list-helix, které spolu zajišťují vazbu na DNA. Motiv interaguje s velkým žlábkem DNA, přičemž arginin z jedné ze smyček zasahuje do malého žlábků DNA. Smyčky jsou částečně drženy pospolu tetraedricky koordinovaným atomem zinku. Tyto oblasti (L2/L3 smyčky, vazebné místo pro Zn, motiv smyčka-list-helix) jsou konzervované a jsou častými místy mutací p53 [132]. I když je vazba p53 na DNA zprostředkována především jeho DNA-vazebnou doménou, pro jeho efektivní navázání na DNA jsou nutné modifikace na jeho C-konci, přičemž pouze protein plné délky je schopný správně rozpoznávat cílová místa na DNA. Navíc se p53 velmi pevně váže na nekanonické struktury DNA a lokální struktury, které ovlivňují jak přirozeně se vyskytují typ p53, tak jeho mutantní formy [6].

V roce 1964 Robin Holliday navrhl model, který vysvětloval tři procesy probíhající při meióze hub (*crossing-over*, genovou konverzi a postmeiotickou segregaci). Principem modelu je, že po replikaci DNA dochází ke vzniku zlomů, které umožňují následné párování komplementárních sekvencí, díky čemu vzniknou dva homologní chromozomy, z nichž následně vzniká křížová struktura, která spojí obě dvoušroubovice. V místě výměny vláken tak vzniká „meziproduct“ rekombinace dnes nazývaný Hollidayův spoj [133]. Bylo prokázáno, že p53 se s vysokou afinitou váže s Hollidayovými spoji. I když jsou Hollidayovy spoje přirozenými meziprodukty rekombinace, poslední studie naznačují, že tyto struktury vznikají i v důsledku poškození DNA. Vazba p53 na poškozenou DNA se prozatím jeví, jako mechanismus indukující nábor opravných proteinů a zároveň iniciující posttranslační modifikace buňky [134, 135]. Negativní nadšroubovicové vinutí a interakce proteinu p53 s DNA vedou ke stabilizaci nekanonických forem DNA, navíc bylo zjištěno, že p53 se váže s vyšší afinitou k nadšroubovicově vinuté DNA oproti stejné sekvenci DNA s lineární topologií [135, 136].

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- Literární rešerše k zadanému tématu
- Izolace a purifikace proteinu p53 standardního typu a jeho mutovaných forem
- Studium interakcí proteinu p53 standardního typu a jeho mutovaných forem *in vitro* prostřednictvím mikroskopie atomárních sil (AFM) a elektroforetických testů posunu mobility (EMSA)
- Studium transkripční aktivity mutantních proteinů p53 *in vivo* v jednohybridním kvasinkovém isogenním systému

- Plazmid pET15b p53-R175H (selekční marker Ampicilin)
- Plazmid pET15b p53-R273H (selekční marker Ampicilin)
- Plazmidy použité pro AFM
 - Plazmid pBluescript SK II (-) – komerčně dostupný plazmid s negativním nadšroubovicovým vinutím, v experimentech použit jako model pro dsDNA (selekční marker Ampicilin)
 - Plazmid pPGM2 – plazmid s negativním nadšroubovicovým vinutím odvozený od pBluescript s inzercí palindromu, v experimentech použit jako model pro křížovou strukturu (selekční marker Ampicilin)
 - Plazmid 3GC – plazmid s negativním nadšroubovicovým vinutím odvozený od pBluescript s inzercí G-kvadruplexu, v experimentech použit jako model pro G-kvadruplexovou strukturu (selekční marker Ampicilin)
- Plazmidy použité pro experimenty v kvasinkovém isogenním systému
 - Plazmid pRS314 (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; selektovatelný marker bakterií – ampicilin (Amp)); použit jako prázdný vektor)
 - Plazmid pRS315 (selektovatelný marker kvasinek – LEU2; selektovatelný marker bakterií – Amp; použit jako prázdný vektor)
 - Plazmid pLS-WT – produkuje protein p53 standardního typu, konstitutivní exprese podmíněná ADH promotorem (selektovatelný marker kvasinek – LEU2; selektovatelný marker bakterií – Amp)
 - Plazmid pTSG-R175H – produkuje mutovaný protein p53-R175H, indukibilní exprese podmíněná *GALI* promotorem (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; selektovatelný marker bakterií – Amp)
 - Plazmid pTSG-R273H – produkuje mutovaný protein p53-R273HH, indukibilní exprese podmíněná *GALI* promotorem (selektovatelný marker kvasinek – TRP1; selektovatelný marker bakterií – Amp)
- Další genetický materiál
 - Nosičová jednořetězcová DNA – Salmon Sperm ssDNA; Thermo Fisher Scientific

4.1.3 Antibiotika a protilátky

- Ampicilin ($100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Chloramfenikol ($25 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$)

4.1.4 Chemikálie

V rámci práce byly použity následující chemikálie a komerčně dostupné sady. Další chemikálie, které se běžně vyskytují v biochemických a molekulárně-biologických laboratořích byly obstarány v nejvyšší možné čistotě a ze seznamu byly vynechány.

- Primární myši monoklonální protilátka DO-1 (1:1 000)
- Sekundární protilátka Anti-Mouse IgG s peroxidázou (1:10 000)
- Adenin (Sigma-Aldrich)
- Agar bakteriální (Oxoid)

- Akrylamid:Bisakrylamid, 19:1 (Serva)
- Akrylamid:Bisakrylamid, 37,5:1 (Serva)
- Ampicilin (Biotika)
- Bradfordovo činidlo (Serva)
- Bromfenolová modř (Lachema)
- Butanol (Penta)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)
- Detekční sada pro bioluminescenci; Bright Glo Luciferase assay (Promega)
- Dodecylsírán sodný (Serva)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (Lach-ner)
- Formamid (Penta)
- Glukóza (Lach-ner)
- Glycerol (Lach-ner)
- Glycin (Lach-ner)
- Chemiluminiscenční substrát, ECL Western Blot detection kit (Thermo Fischer)
- Chloramfenikol (Duchefa Biochemie)
- Imidazol (Serva)
- Inhibitory proteáz (Roche)
- Isopropanol (Penta)
- Isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (MP Biomedicals)
- Kvasinkový extrakt (Duchefa Biochemie)
- Kyselina octová (Lach-ner)
- Metanol (Penta)
- Merkaptoethanol (Serva)
- Passive Lysis Buffer (Promega)
- Peroxodisírán amonný (VWR Life Science)
- Sada pro izolaci plazmidové DNA, E.Z.N.A Plasmid DNA Mini Kit I Omega (BIO-TEK)
- Stains-all (Sigma-Aldrich)
- Sušené odtučněné mléko (Nutistar)
- Talon metal affinity Resign (Takara)
- Tetramethylethylendiamin (Sigma Aldrich)
- Tris (Serva)
- Triton X-100 (Roth)
- Trypton (Duchefa Biochemie)
- Xylencyanová fialová (Sigma Aldrich)
- Základ pro kompletní kvasinkové médium (Sigma Aldrich)
- Základní médium s dusíkem pro kvasinky (Sigma Aldrich)

4.1.5 Přístrojové vybavení

- Autokláv Microjet Personal microwave autoclave (Enbio)
- CD spektropolarimetr Jasco-815 (Jasco International Co.)
- Centrifuga 5 804 R (Eppendorf)

- Centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf)
- Elektroforetická aparatura Mini Protean Tetra Cell Systém (Bio-Rad)
- Elektroforetická aparatura Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
- ELISA Reader Synergy H1 Hybrid Multi-mode Reader (Bio Tek)
- Homogenizátor Pellet mixer (VWR)
- Inkubátor Innova 44 (New Brunswick Scientific)
- LAS 3 000 (FUJIFILM)
- Magnetická míchačka MSH-30A (WiseStir)
- Naklánědlo Multi Rotator RS-60 (Biosan)
- Předvážky TE 412 (Sartorius)
- Spektrofotometr NanoDrop DS-11 FX (DeNovix)
- Spektrofotometr Specord 200 Plus (Analytik Jena)
- Sonikátor Dynatech (Dynatech)
- Termoblok Thermomixer comfort 1,5 ml (Eppendorf)
- Třepačka Yellow line os 5 basic (Marconi)
- Vortex IKA 4 digital (IKA)
- Zdroj napětí PowerPac 300 (Bio-Rad)

4.2 Složení médií a dalších použitých roztoků

LB médium tekuté	1,0 % trypton, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1,0 % NaCl
Kompletní tekuté neselektivní médium (YPDA)	50 g·l ⁻¹ YPD broth, 200 mg·l ⁻¹ adenin
Kompletní pevné neselektivní médium (YPDA misky)	50 g·l ⁻¹ YPD broth, 200 mg·l ⁻¹ adenin, 2 % agar
Syntetické leucin-tryptofan selektivní misky ItA	6,7 g·l ⁻¹ <i>Yeast Nitrogene base</i> , 2 % agar, 2 % dextróza, 200 mg·l ⁻¹ adenin, 20 mg·l ⁻¹ histidin, 90 mg·l ⁻¹ lysin, 20 mg·l ⁻¹ uracil
Syntetické leucin-tryptofan selektivní tekuté médium (SRItA – luciferázové testy)	6,7 g·l ⁻¹ <i>Yeast Nitrogene base</i> , 2 % rafinosa, 200 mg·l ⁻¹ adenin, 20 mg·l ⁻¹ histidin, 90 mg·l ⁻¹ lysin, 20 mg·l ⁻¹ uracil
Eluční pufr	500 mM imidazol, 20 mM Tris (pH 8), 500 mM NaCl, 1 mM β-Merkaptoetanol, 5 % glycerol
Lyzační pufr	5 mM imidazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl 1 mM β-Merkaptoetanol, 0,1 % Triton X-100, 5 % glycerol
Promývací pufr	10 mM imidazol, 20 mM Tris (pH 8), 500 mM NaCl, 1 mM β-ME, 5 % glycerol
Vazebný pufr	5 mM imidazol, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 1 mM β-Merkaptoetanol, 5 % glycerol
Akrylamid; 5%	5 % 37,5:1 akrylamid:bisakrylamid, 0,375 M Tris (pH 8,8), 0,1 % SDS, Persíran amonný (0,005x AA), Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
Akrylamid; 15%	15 % 37,5:1 akrylamid:bisakrylamid

Blokovací roztok	0,375 M Tris (pH 8,8), 0,1 % SDS, Persíran amonný (0,005x AA), Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
Blotovací pufr; 10x	1x PBS, 5 % odtučněné sušené mléko
Coomassie Blue; barvicí roztok	25 mM Tris, 0,192 M glycin, pH 8,3
CSB nanášecí pufr; 5x	0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % metanol, 10 % kyselina octová
Destain; odbarvovací roztok	100 mM Tris (pH 6,8), 10 % glycerol, 4 % SDS, 200 mM β -merkaptoethanol, 0,1 % bromfenolová modrá
PBS; 10x	40 % methanol, 10 % ledová kyselina octová
SDS-PAGE Running buffer; 10x	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_3
Akrylamid; 4%	25 mM Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Akrylamid; 8%	4 % 19:1 akrylamid:bisakrylamid, 0,33x TBE, 50 mM KCl, Persíran amonný (0,005x AA), Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
LB nanášecí pufr; 6x	8 % 19:1 akrylamid:bisakrylamid, 0,33x TBE, 50 mM KCl, Persíran amonný (0,005x AA), Tetramethylethylendiamin (0,003x AA)
TBE; 10x	40 % sacharóza, 0,2 % bromfenolová modrá, 0,2 % xylencyanová fialová
Vazebný pufr; 20x	900 mM Tris, 900 mM H_3BO_3 , 10 mM EDTA (pH 8,3)
LiAc/TE/PEG	50 mM KCl, 5 mM Tris (pH 7), 0,01 % Triton X-100
LiAc/TE	100 mM dihydrátu octanu lithného, 1x TE pufr, 58 % PEG
TE pufr; 10x	100 mM dihydrátu octanu lithného, 1x TE pufr
AFM pufr	100 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, pH 8
Vazebný pufr (AFM)	4 mM HEPES, 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2
Fosfátový pufr	5 mM Tris-HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0,01 % Triton X-100
Lyzační pufr (PCR)	KH_2PO_4 12,6 mM, K_2HPO_4 54 mM, glukóza 55,5 mM
TBE; 0,33x	1 M LiAC, 20 % SDS
	10x TBE, 3 M KCl, 50 mM KCl

4.3 Metody

4.3.1 Transformace bakterií

Kompetentní buňky *Escherichia coli* BL21 Codon⁺ byly po rozmražení na ledě rozpipetovány do sterilních mikrocentrifugačních zkumavek po 50 μ l. K buňkám byla následně přidána plazmidová DNA (50 ng) pro expresi proteinů p53-WT, p53-R273H, p53-R175H. Rovněž byla připravena negativní kontrola bez plazmidové DNA. Buňky byly inkubovány 30 minut na ledě, poté byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 45 s a buňky byly přesunuty na 2 minuty na led. Bylo přidáno 250 μ l SOC media předeřátého na 37 °C. Buňky byly inkubovány při 37 °C a 250 rpm po dobu 1 hodiny. Na selektivní Petriho misky s obsahem antibiotika (ampicilin a chloramfenikol) bylo rozetřeno 100 μ l směsi. Transformanty byly inkubovány do druhého dne při 37 °C.

4.3.2 Izolace proteinů proteinovou afinitní chromatografií

Proteiny rodiny p53 byly izolovány z předem připravených bakteriálních kultur *E. coli* BL21 Codon⁺. Buňky byly transformovány plazmidovými vektory pET15b, které produkovaly proteiny spojený s polyhistidinovou kotvou (tzv. His-tag). Následné izolace a purifikace byly provedeny dle postupu níže. Výsledná koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky metodou dle Bradforda.

4.3.2.1 Příprava bakteriální kultury

První den byla do 10 ml LB média obsahujícího antibiotika ampicilin a chloramfenikol s koncentracemi 100 a 25 μ l·l⁻¹ zočkována kultura *Escherichia coli* BL21-CodonPlus, která byla uchovávána v mrazicím boxu při -80 °C. Inokulant byl kultivován do dalšího dne za stálého třepání při 37 °C. Další den bylo 10 ml média s narostlou kulturou přeneseno do předeřátého LB média s přidavkem obou antibiotik a 50 μ M ZnCl₂ o objemu 1 l. Takto připravené médium bylo kultivováno v 5 l kultivační Erlenmeyerově baňce za stálého třepání při 37 °C. Během inkubace byla průběžně sledována hodnota optické hustoty kultury UV/VIS spektrometrem *Specord PLUS 210* při vlnové délce 600 nm proti slepému vzorku, slepým vzorkem bylo médium bez kultury. Po dosažení absorbance 0,6 byl z bakteriální kultury odebrán 1 ml jako kontrola exprese proteinu před indukcí (K1). Následně byl přidán 1,0 ml 1,0M roztoku IPTG, který indukoval expresi proteinů p53 s polyhistidinovou kotvou. Kultura byla inkubována do druhého dne v kultivační Erlenmeyerově baňce při 16 °C a 100 rpm.

4.3.2.2 Lýze buněk

Z bakteriální kultury po indukci byla odebrána 1 ml kultury jako kontrola K2. Obsah kultivační Erlenmeyerovy baňky byl převeden do centrifugačních kyvet a centrifugován při 6 500 g po dobu 20 minut. Lýze buněk byla prováděna na ledě. Supernatant byl po centrifugaci odebrán a do jedné z kyvet bylo přidáno 40 ml lyzačního pufru s rozpuštěnou tabletou inhibitorů proteáz. Obsah kyvety byl resuspendován homogenizátorem, převeden do další kyvety a znovu resuspendován. Krok byl opakován u všech kyvet. Výsledná

směs bakteriální kultury s roztokem inhibitorů byla sonikována na ledě při amplitudě 60 %, v deseti cyklech, po dobu 30 sekund s 30sekundovými přestávkami. Lyzované buňky byly centrifugovány při 4 °C a 14 000 g po dobu 30 minut. Supernatant byl převeden do centrifugačních zkumavek a pelet, který obsahoval nerozpustný protein, byl odstraněn. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml vzorku jako kontrola K3.

4.3.2.3 Izolace proteinů p53

Ke 4 ml promytých kuliček *TALON Metal Affinity resin 635504 Clontech* ve směsi s ethanolem bylo přidáno 40 ml vazebného pufru a směs byla důkladně promíchána. Následovala centrifugace při 4 °C a 2 000 g po dobu 5 minut. Supernatant z centrifugace buněk byl přidán ke kuličkám *TALON Metal Affinity resin* a ponechán při 4 °C na naklánědle *Multi Rotstor RS-60* podobu 1,5 hodiny. Směs byla stočena při 2 000 g po dobu 5 minut. Ze supernatantu po centrifugaci byla odebrána kontrola vzorku K4, 1 ml. Zbýlý supernatant byl odstraněn. K peletu bylo přidáno 40 ml vazebného pufru a roztok byl důkladně promíchán a centrifugován při 4 °C a 2 000 g po dobu 5 minut. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml vzorku jako kontrola K5. Zbytek supernatant byl odstraněn. K peletu bylo přidáno 40 ml promývacího pufru. Směs byla promíchána a spolu s kuličkami kvantitativně převedena do kolony. Kontrola K6 byla odebrána z přefiltrovaného promývacího pufru. Po přefiltrování veškerého promývacího pufru byla eluce indukována přidávkem 1 ml elučního pufru. Každý přidavek pufru byl odebrán jako jedna eluce. Celkem bylo odebráno šest elucí po 1 ml do 1,5ml mikrozkušavek. Pro spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů v eluci a Western blot bylo odebráno z každé eluce 50 µl. Vzorky elucí byly následně zmrazeny pomocí tekutého dusíku a uchovávány při -80 °C.

4.3.3 Western blot

K charakterizaci izolovaných proteinů (ověření stavu fragmentace, oligomerizace a eventuální kontaminace jinými proteiny), byl proveden Western blot. Byly připraveny dva polyakrylamidové gely o tloušťce 1,5 mm s přidávkem SDS (dodecylsírán sodný). Připravené gely byly tvořeny dvěma vrstvami. Spodní vrstva byla tvořena 10% akrylamidem s SDS. Vrchní vrstva byla tvořena 5% akrylamidem s SDS. Polymerace byla indukována přidávkem APS (peroxidisírán amonný) a Temeđu (*N,N,N',N'*-tetramethylethan-1,2-diamin).

4.3.3.1 SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS)

Proteinové eluce byly přenášeny po 10 µl do čistých mikrozkušavek a následně bylo do mikrozkušavek přidáno 2,5 µl 5x koncentrovaného CSB (cytokin stabilizační pufr; z angl. cytokine stabilization buffer) pufru. Takto připravené vzorky byly poté po 5 µl pipetovány do jamek gelu. Stejným způsobem jako eluční vzorky byla připravená pozitivní kontrola (HIN-A doména proteinu IFI16), která také obsahovala polyhistidinovou kotvu. Vzorky kontrol K1 a K2 byly před pipetováním do mikrozkušavek krátce centrifugovány. Supernatant o objemu 20 µl byl přidán k 80 µl ultračisté vody a 20 µl 5x koncentrovaného CSB pufru. Do jamek gelů bylo nanášeno 20 µl směsí. Vzorky kontrol K3–K6 o objemu 30 µl byly přeneseny do čistých mikrozkušavek obsahujících 7,5 µl 5x koncentrovaného CSB nanášecího

pufri. Do jamek gelu bylo pipetováno 18 μ l připravených vzorků. Všechny vzorky před pipetováním do jamek elektroforetického gelu byly po dobu 5 minut denaturovány v termobloku při 95 °C. Rovněž byl nanesen komerční proteinový žebříček (10 000–250 000 Da). Vertikální elektroforéza probíhala v přítomnosti 1x koncentrovaného SDS-PAGE pufri po dobu 15 minut při 50 V, poté 15 minut při 100 V a poté při 150 V po dobu 60 minut. Posléze byl jeden gel obarven pomocí barviva *Coomassie Brilliant Blue* a druhý byl použit na westernový přenos.

4.3.3.2 Barvení gelu pomocí barviva *Coomassie Brilliant Blue*

Jeden z gelů byl po SDS-PAGE vložen do skleněné vany a inkubován s barvivem *Coomassie Brilliant Blue* po dobu 20 minut, za stálého třepání (80 rpm) při laboratorní teplotě. Poté byl gel 3krát promyt odbarvovacím roztokem *Destain* za stálého třepání (80 rpm) vždy po 20 minutách. Po třetím promytí byl gel inkubován v roztoku *Destain* při laboratorní teplotě a za stálého třepání do druhého dne. Gel byl snímán kolorimetricky.

4.3.3.3 Westernový přenos

Druhý gel byl přenesen do prostředí obsahující 1x koncentrovaný blotovací pufr s přídavkem methanolu a překryt nitrocelulózovou membránou a dvěma vrstvami filtračního papíru. Takto připravený „sandwich“ byl vložen do blotovacího nástavce. Western Blot byl prováděn po dobu 90 minut při 150 mA za přítomnosti 1x koncentrovaného blotovacího pufri. Následně byla provedena imunodetekce na nitrocelulózové membráně, která byla promytá 1x koncentrovaným roztokem PBS.

4.3.3.4 Imunodetekce nitrocelulózové membrány

Nitrocelulózová membrána byla inkubována 30 minut v blokovacím roztoku a následně zalita myší primární protilátkou (poměr 1:1 000) proti polyhistidinové kotvě. Membrána s protilátkou byla inkubována za stálého třepání do druhého dne při 4 °C. Následující den byla primární protilátka slita a membrána byla 5x promyta 1x koncentrovaným roztokem PBS – vždy po 5 minutách za stálého třepání (80 rpm). Membrána byla převrstvena myší sekundární protilátkou Anti-Mouse IgG obsahující peroxidázu v 10 ml blotovacího roztoku v poměru 1:10 000. Membrána s protilátkou byla inkubována za stálého třepání (160 rpm) 1 hodinu za laboratorní teploty. Blokovací roztok obsahující sekundární protilátku byl slit a membrána byla 5x promývána 1x koncentrovaným PBS – vždy po 5 minutách a za stálého třepání. Následně byla membrána převrstvena 1 ml detekční směsí *ECL Western Blot detection kit*. Chemiluminescence byla snímána na přístroji *Amersham Imager 680*.

4.3.4 Hybridizace oligonukleotidů

Syntetické nukleotidy obsahující FAM značení byly hybridizovány dle postupu uvedeném v článku *IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation* [137]. Oligonukleotidy, byly zředěny na koncentraci 10 μ M 1x koncentrovaným TE pufrem, který obsahoval 50 mM KCl. Takto připravené vzorky byly

denaturovány při 95 °C po dobu 10 min. Zdenaturované vzorky byly postupně ochlazovány na laboratorní teplotu.

4.3.5 Elektroforetické testy posunu mobility (EMSA)

Vazba vybraných proteinů p53 k hybridizovaným oligonukleotidům s předpokladem tvorby různých sekundárních struktur *in vitro* byla provedena pomocí EMSA v akrylamidovém gelu. Označené oligonukleotidy o koncentraci 5 pmol a proteiny p53 byly smíchány v různých poměrech (1:0 / 1:1 / 1:2 / 1:4 / 1:8 / 1:16) v 15 µl vazebného DNA pufru a DTT o výsledné koncentraci 1x (vazebný pufr) a 1mM (DTT) a dále inkubovány 10 min při 4 °C a dány na nedenaturující polyakrylamidové gely tvořené 4% horní a 8% spodní vrstvou obsahující akrylamidu:bisakrylamidu v poměru 19:1 a přídatkem 0,33x TRIS-borát-EDTA pufru a 50 mM KCl. Elektroforéza byla provedena po dobu 1,5 hodin při 50 V při 4 °C. Vazebné experimenty byly provedeny se vzorky elucí, které na základě spektrofotometrického stanovení vykazovaly nejvyšší koncentrace proteinu a na základě předešlé charakterizace SDS-PAGE a westernového přenosu vykazovaly nejvyšší čistotu.

4.3.6 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Vzorky elucí proteinů byly smíchány s 200 ng plazmidů v molárním poměru 1:16, ke směsi byl přidán vazebný pufr a ultračistá voda do výsledného objemu 20 µl. Vzorky byly inkubovány 15 min a poté k nim bylo přidáno 80 µl AFM pufru. Vzorky byly po 10 µl přeneseny na slídové terčíky a ponechány 5 min schnout, následně byly promyty 2 ml vody a ponechány do druhého dne v sušárně při teplotě 37 °C. Snímky byly získány pomocí elektrochemického systému *AFM/STM Multimode 8* (Veeco, USA), pracujícího v režimu ScanAsyst při pokojové teplotě na vzduchu. Získané snímky byly následně analyzovány pomocí programu Gwyddion.

4.3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro extrakci genomové DNA z kvasinkových kmenů byl využit protokol *Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications* [138]. Z křížových roztěrů příslušných kmenů na Petriho miskách byla odebrána vždy 1 kolonie, která byla resuspendována ve 100 µl PCR lyzačního pufru s 1% SDS. Připravená směs byla inkubována po dobu 5 min při teplotě 70 °C.

Dalším krokem bylo přidání 300 µl 99,98% ethanolu pro UV spektroskopii a promíchání směsi pomocí vortexu. Poté byla směs pufru, alkoholu a vzorku inkubována při 70 °C po dobu 5 minut. Směs byla po inkubaci centrifugována po dobu 3 min při 14 000 rpm. Supernatant byl odsát a pelet byl promyt 300 µl 70% ethanolu. Směs byla promíchána na vortexu a opět centrifugována za stejných podmínek, jako v předešlém kroku. Dále byl supernatant znovu odsát a k peletu bylo přidáno 100 µl ultračisté vody, ve které byl následně resuspendován a stočen po dobu 15 s při 14 000 rpm. Supernatant izolované genomové DNA o objemu 1 µl byl pipetován k PCR směsi obsahující následující komponenty:

- 5 µl 10x PCR pufru
- 4 µl 2,5 mM dNTPs
- 1 µl primeru Luc-zpětný o koncentraci 10 µM
- 1 µl primeru Ade-přímý o koncentraci 10 µM

- 0,25 µl Taq polymerázy
- 37,75 µl ultračisté vody

Počáteční denaturace při PCR reakci trvala 8 min při teplotě 94 °C, poté proběhlo 35 opakujících se cyklů denaturace, nasednutí primerů a polymerace, kdy krok denaturace (94 °C) probíhal po dobu 1 min, krok nasedání primerů (55 °C) trval 1 min a následná polymerace probíhala při 72 °C po dobu 2 min. Závěrečná elongace probíhala 5 min za teploty 72 °C.

Po ukončení PCR bylo nanášeno 10 µl směsi na 1% agarózový gel, který obsahoval barvivo *Gel Red*. Agarózová elektroforéza probíhala v prostředí 1x koncentrovaného TAE pufru za laboratorní teploty po dobu 45 min na 90 V.

4.3.8 Přečistění DNA po PCR

Přečistění vzorků DNA po PCR bylo provedeno na základě protokolu, přiloženého u použitého kitu (Qiagen). Směs obsahující amplifikovanou DNA byla přenesena do čisté mikrozkušavky a doplněna ultračistou vodou na objem 100 µl. Ke směsi bylo přidáno 500 µl vazebného pufru. Poté byl takto připravený roztok přenesen na kolonu a vše bylo centrifugováno při 14 000 rpm po dobu 1 min. Navázaná DNA byla 2x promyta pomocí promývacího pufru o objemu 500 µl a 200 µl. Po druhém promytí byla kolona přenesena do čisté mikrocentrifugační zkumavky. Na fritu s navázanou DNA byl nanášen eluční pufr o objemu 20 µl. Kolonka byla s DNA centrifugována při 14 000 rpm po dobu 1 min. Po izolaci byla proměřena koncentrace a čistota genomové DNA při 260 nm na přístroji NanoDrop 2 000. Pomocí takto zjištěných koncentrací byl vypočten objem, který byl potřebný pro sekvenaci, aby bylo dosaženo koncentrace 5 ng/µl v 15 µl roztoku. Ke vzorkům byly přidány 2 µl primeru Luc-zpětný. Tyto vzorky byly následně odeslány do firmy Eurofins Genomics na Sangerovo sekvenování.

4.3.9 Transformace kvasinkových kultur lithium-acetátovou metodou

Pro transformaci kvasinkových kultur bylo nutné nejprve připravit bakteriální kultury k izolaci plazmidové DNA. K tomuto účelu byl použit *E.Z.N.A Plasmid Mini Kit*. Bakteriální kultury byly inkubovány v LB médiu s přídavkem ampicilinu v poměru 1:1 000, při 37 °C do druhého dne za stálého třepání. Druhý den bylo do čisté mikrotitrační zkumavky pipetováno 1 000 µl inokula, které bylo centrifugováno po dobu 1 minuty při 10 000 rpm. Supernant byl slit a poté bylo přidáno dalších 1 000 µl inokula. Tento krok byl opakován do doby, než došlo k získání obsahu z celého inokula. Následně bylo třeba provést lýzi buněk. Byl odstraněn supernatant a k peletu byl přidán roztok obsahující RNázy. Obsah byl centrifugován a přenesen do nové mikrotitrační zkumavky, do které bylo přidáno 250 µl roztoku obsahujícího lyzační enzymy. Směs byla jemně promíchána. Dále bylo k lyzovaným buňkám přidáno 350 µl neutralizačního roztoku. Směs byla opětovně promíchána otáčivými pohyby, dokud nevznikla bílá sraženina. Obsah zkumavky byl centrifugován při 14 000 rpm po dobu 10 minut. Supernatant po centrifugaci byl přenesen na fritu kolonky pro izolaci pDNA, která byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 1 minuty. Filtrát byl slit a na kolonu bylo přidáno 500 µl HBC pufru s obsahem 100 % isopropanolu. Centrifugace byla provedena dle podmínek výše. Filtrát byl slit a bylo přidáno 700 µl DNA promývacího pufru obsahujícího 100 % ethanol. Centrifugace

probíhala při 14 000 rpm 30 vteřin. Filtrát byl odlit a znovu byla provedena centrifugace s prázdnou fritou k úplnému odstranění zbytků pufru. Kolonka byla přenesena do nové mikrocentrifugační zkumavky a fritka byla promyta 75 μ l elučního pufru. Fritka s elučním pufrem byla inkubována po dobu 5 minut a následně byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 1 minuty. U vzorků izolované pDNA byla stanovena koncentrace na NanoDropu proti elučnímu pufrem.

Kvasinkové kmeny [CFNO, GCG, XA, XG-TT, PUMA RE, PUMA RE + G4, MDM2 RE, MDM2 RE + G4, Trim32 RE, Trim32 RE + G4, PU21] byly založeny do 5 ml YPDA tekutého média a inkubovány za stálého třepání při 30 °C do druhého dne. Druhý den bylo k 5 ml inokula přidáno 45 ml roztoku YPDA (kvasničný pepton dextróza adenin; z angl. yeast peptone dextrose adenine). Směs byla přelita do Erlenmeyerovy baňky a třepána 4 hodiny při 30 °C. Kvasinková kultura byla po 4 hodinách stočena po dobu 3 minut a 8 000 rpm. Supernatant byl odlit a k buňkám bylo přidáno 50 ml ultračisté vody. Pelet byl protřepán a 3 minuty centrifugován při 8 000 rpm. Supernatant byl slit a k peletu bylo přidáno dalších 10 ml vody a krátce centrifugováno. Po promytí bylo k peletu přidáno 10 ml ultračisté vody a opět centrifugováno za stejných podmínek. Pelet byl znovu promyt 3 ml LiAc/TE pufrem. Buňky byly zakoncentrovány v 600 μ l LiAc/Te pufrem.

K 50 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 300 μ l PEG (polyethylenglykol)/LiAc/TE, 2 μ l plazmidu nebo 3 μ l oligonukleotidu, 5 μ l *salmon sperm* v koncentraci 10 mg/ml. *Salmon sperm* byl samotný inkubován před přidáním do směsi po dobu 10 min na 95 °C, poté byl přemístěn na led. Následně byly mikrocentrifugační zkumavky obsahující pelet a transformační směs centrifugovány po dobu 30 min a poté dány do vodní lázně při 42 °C a 15 min. Následně byly opět centrifugovány při 3 000 g po dobu 3 min. PEG byl odsát a pelet byl resuspendován ve 100 μ l vody. Transformanty byly rozetřeny na selektivní Petriho misky a inkubovány 2 dny při 30 °C.

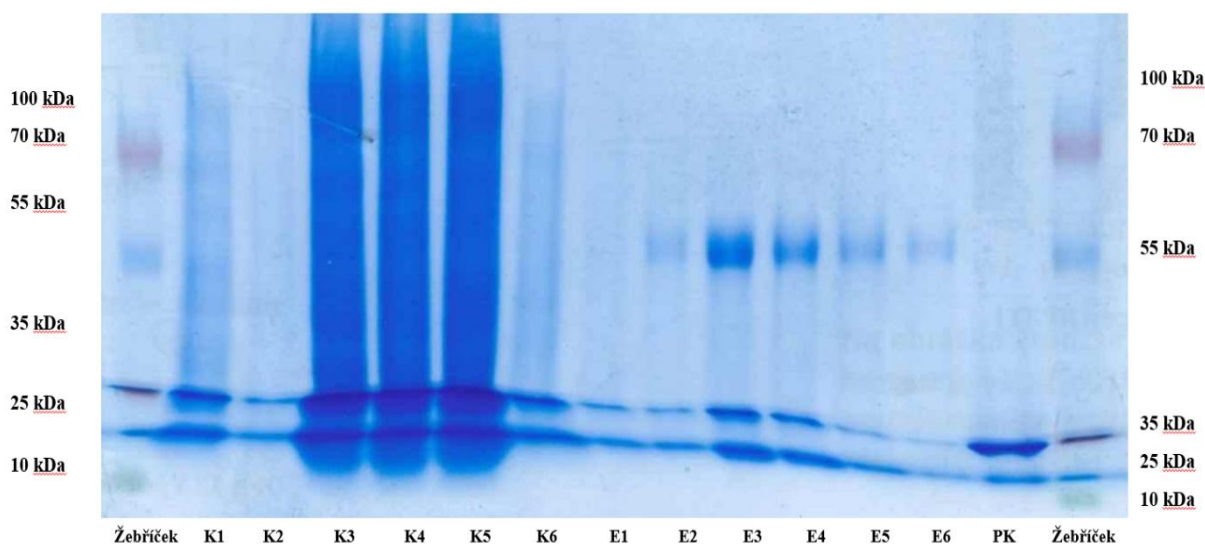
4.3.10 Luciferázové reportérové testy

Bylo odebráno šest kolonií z kvasinkových transformantů a ty byly rozetřeny na selektivní ItA misky po šesti čtvrcích. Takto připravené roztěry byly inkubovány po dobu 2 dnů při 30 °C. Po 2 dnech bylo odebráno z každého transformantu (z pěti roztěrů) malé množství buněčné kultury, které bylo resuspendováno ve 200 μ l syntetického leucin-tryptofan selektivního tekutého média s glukosou (SRItA médium) v 96 jamkové titrační destičce. Následně bylo 50 μ l z těchto zásobních kultur přeneseno do SRItA média s galaktosou o koncentraci 0,032 %, dalších 50 μ l bylo přeneseno do SRItA média s galaktosou o koncentraci 2 %. Takto připravené kultury byly inkubovány 6 hodin při 30 °C za stálého třepání. Po 6 hodinách bylo k 10 μ l vzorků přidáno 10 μ l 2x koncentrovaného lyzačního pufru *Passive Lysis Buffer* v poměru 1:1. Směs byla poté 15 min inkubována za stálého třepání při 500 rpm za laboratorní teploty. Poté bylo přidáno 10 μ l luciferázového substrátu *Bright Glo Luciferase assay* a ihned po inkubaci byla změřena bioluminiscence a optická hustota kultur při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) pomocí přístroje *Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader*.

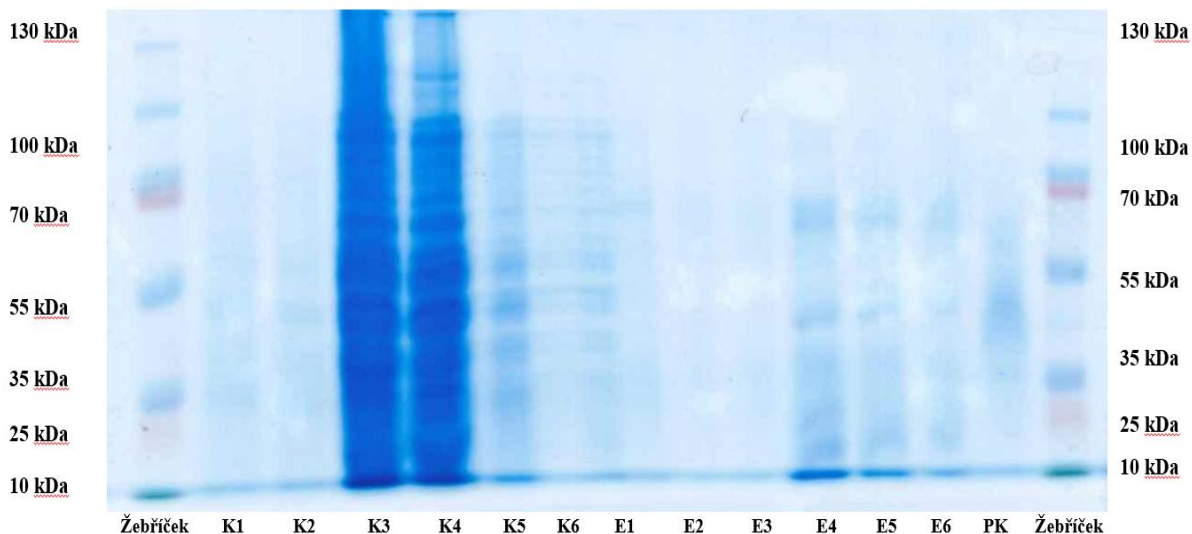
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Izolace a charakterizace proteinů

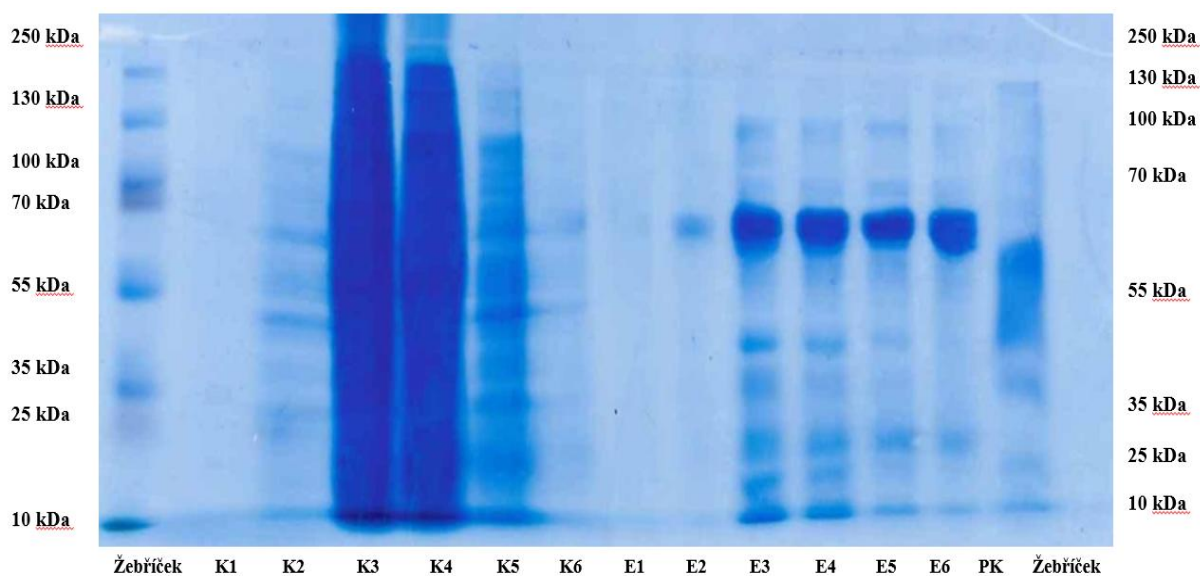
Cílem této diplomové práce bylo mimo jiné izolovat a purifikovat protein p53 a jeho mutanty R175H a R273H z bakteriálního expresního systému. K následujícím experimentům (vazebné experimenty, AFM) bylo třeba získat proteiny splňující několik kritérií – proteiny musely být získány v co nejvyšší koncentraci a zároveň musely být co možná nejčistší a nefragmentované. Proteiny byly izolovány dle postupů popsaných v podkapitole 4.3.2 *Izolace proteinů afinitní chromatografií*. Jako pozitivní kontrola byla použita HIN A doména proteinu IFI16 obsahující His-tag kotvu. Během izolace byly odebírány kontroly K1–K6 a 6 elucí od každého proteinu p53. Zjištění stavu fragmentace proteinu bylo provedeno pomocí Western blot metody a barvení gelu pomocí barviva *Coomassie Blue*. Vzorky byly separovány pomocí vertikální elektroforézy ve dvourvrstvých polyakrylamidových gelech s SDS. Pro každý protein byly připraveny 2 gely, z nichž jeden byl následně barven a druhý byl použit pro westernový přenos. Do jamky 1 byl nanesen proteinový žebříček, který má rozsah 10–250 kDa, jamky 2 až 7 obsahovaly vzorky kontrol K1–K6, do jamek 8 až 13 byly pipetovány vzorky elucí E1–E6 proteinů p53. Do jamky 14 byla pipetována pozitivní kontrola s polyhistidinovou kotvou, jamka 15 obsahovala žebříček. Na obrázcích 5.1.1 až 5.1.3 jsou výsledky barvení a odbarvení gelů pomocí barvicího roztoku *Coomassie Blue* a odbarvovacího roztoku *Destain*. Proteiny na druhém gelu byly přeneseny pomocí westernového přenosu na nitrocelulózovou membránu a jejich přítomnost byla prokázána pomocí imunodetekce. Na nitrocelulózovou membránu byla nanesena myši primární monoklonální protilátka mající afinitu His-tag kotvě. Sekundární protilátka *Anti-Mouse IgG* byla konjugována s peroxidázou. Chemiluminescence byla snímána přístrojem *Amersham Imager 680*. Výsledky imunodetekce zachycují obrázky 5.1.4 až 5.1.6.



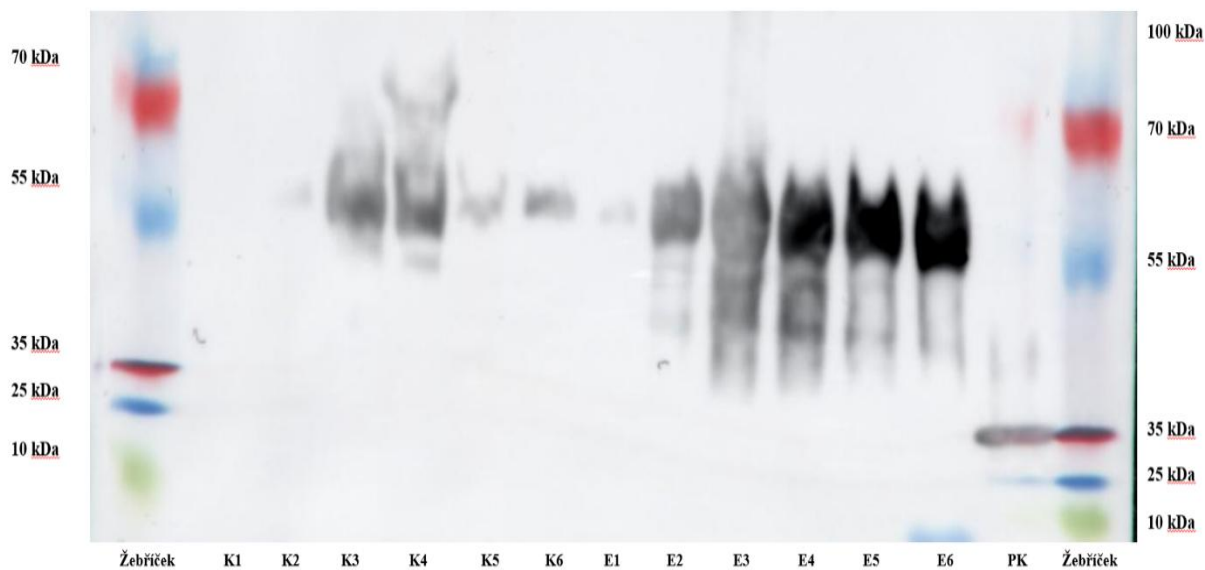
Obrázek 5.1.1: Gel po barvení barvivem *Coomassie Blue*, potvrzující výskyt proteinu p53-WT. Bylo naneseno 6 kontrolních vzorků, pozitivní kontrola a 6 elucí z nichž nejvyšší koncentraci měly eluce E3 až E5, kde je patrný protein o velikosti 55 kDa.



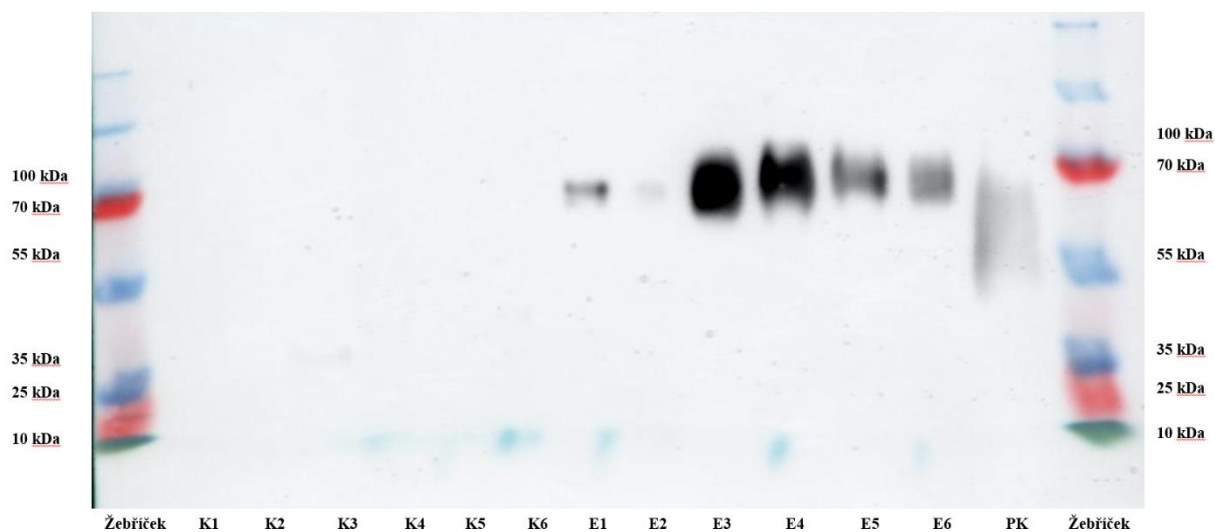
Obrázek 5.1.2: Gel po barvení barvivem Coomassie Blue, potvrzující výskyt proteinu p53-R175H. Bylo naneseno 6 kontrolních vzorků, pozitivní kontrola a 6 elucí z nichž nejvyšší koncentraci měly eluce E4 až E6, kde je patrný protein o velikosti 55 kDa.



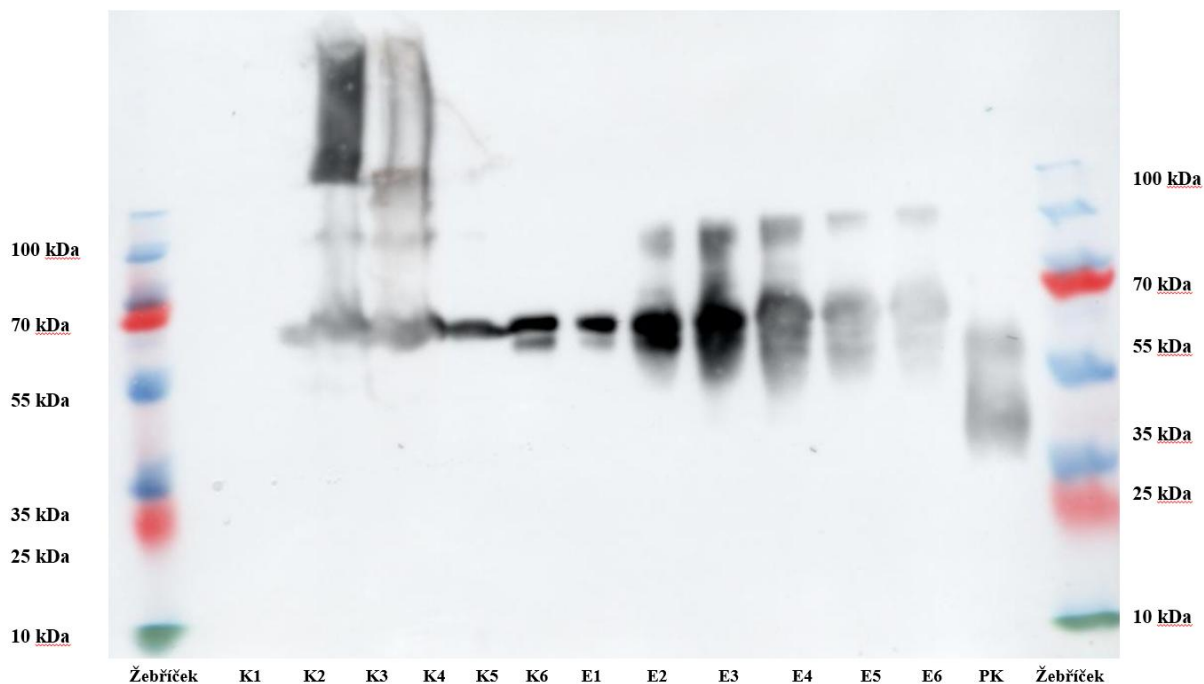
Obrázek 5.1.3: Gel po barvení barvivem Coomassie Blue, potvrzující výskyt proteinu p53-R273H. Bylo naneseno 6 kontrolních vzorků, pozitivní kontrola a 6 elucí z nichž nejvyšší koncentraci měly eluce E3 až E6, kde je patrný protein o velikosti 55 kDa.



Obrázek 5.1.4: Nitrocelulozová membrána s proteinem p53-WT po imunodetekci. V jamkách se nacházel žebříček s rozsahem 10–250 kDa, dále jamky obsahovaly kontroly, označené K1–K6, odebírané v průběhu izolace. Jamky označeny E1–E6 obsahují vzorky elucí proteinu p53-WT plné délky. Předposlední dráha obsahovala pozitivní kontrolu.



Obrázek 5.1.5: Nitrocelulozová membrána s proteinem p53-R175H po imunodetekci. V jamkách se nacházel žebříček s rozsahem 10–250 kDa, dále jamky obsahovaly kontroly, označené K1–K6, odebírané v průběhu izolace. Jamky označeny E1–E6 obsahují vzorky elucí proteinu p53-R175H plné délky. Předposlední dráha obsahovala pozitivní kontrolu.



Obrázek 5.1.6: Nitrocelulozová membrána s proteinem p53-273H po imunodetekci. V jamkách se nacházel žebříček s rozsahem 10–250 kDa, dále jamky obsahovaly kontroly, označené K1–K6, odebírané v průběhu izolace. Jamky označeny E1–E6 obsahují vzorky elucí proteinu p53-R273H plné délky. Předposlední dráha obsahovala pozitivní kontrolu.

Obrázky potvrzují přítomnost proteinu p53 i jeho mutantních forem p53 R175H a p53 R273H v elucích E2–E6. Proteiny byly izolované v plné délce a dle výsledků se významně nefragmentovaly. Nejvyšší a nejlepší výtěžky byly naměřeny pro eluce E3–E5. Na snímku odbarveného gelu pro mutant R175H (Obrázek 5.1.2) je jasně patrný nižší signál oproti WT, či mutantu R273H. Přestože byly výtěžky mutantu R175H nižší, byly dostatečné pro vazebné experimenty a mikroskopii atomárních sil.

Jak vidíme na obrázku 5.1.4 protein p53 standardního typu se nachází zejména v elucích E2–E6, dle snímku se p53-WT nacházel i v první eluci, ale jeho koncentrace zde byla nižší než v dalších elucích. Mutantní forma R175H (Obrázek 5.1.5) vykazovala zřetelný band ve vzorcích elucí E3–E5, zatímco v elucích E1, E2 a E6 byla přítomnost mutantu již opravdu velmi málo patrná, což odpovídá buď špatnému rozlišení při pořizování snímku, nebo příliš nízké koncentraci proteinu v elucích. Mutantní forma R273H (Obrázek 5.1.6) má nejvýraznější bandy v elucích E1–E4, poté jeho eluované množství evidentně klesalo.

Takto bylo prokázáno, že ve vzorcích elucí izolovaných proteinů se nachází námi studovaný protein a jeho mutanti. Pro sledování vazby proteinu p53 a jeho mutantů na DNA ve vazebných experimentech, bylo nutné stanovit přesnou koncentraci proteinu ve vzorcích elucí. Což bylo provedeno pomocí spektrofotometrické metody dle Bradfordové. Vzorky byly smíchány s roztokem 1x koncentrovaného Bradfordova činidla a přeneseny na 96jamkovou destičku a po 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla stanovena jejich koncentrace pomocí přístroje *Hybrid Reader*. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 5.1.1.

Tabulka 5.1.1: Stanovení koncentrace izolovaných proteinů.

Protein	Koncentrace proteinu [g/l]					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
p53-WT	0,192	0,248	1,669	0,541	0,265	0,187
p53-R175H	0,049	0,380	0,571	0,873	0,443	0,100
p53-R273H	0,153	1,032	1,627	1,558	1,180	1,435

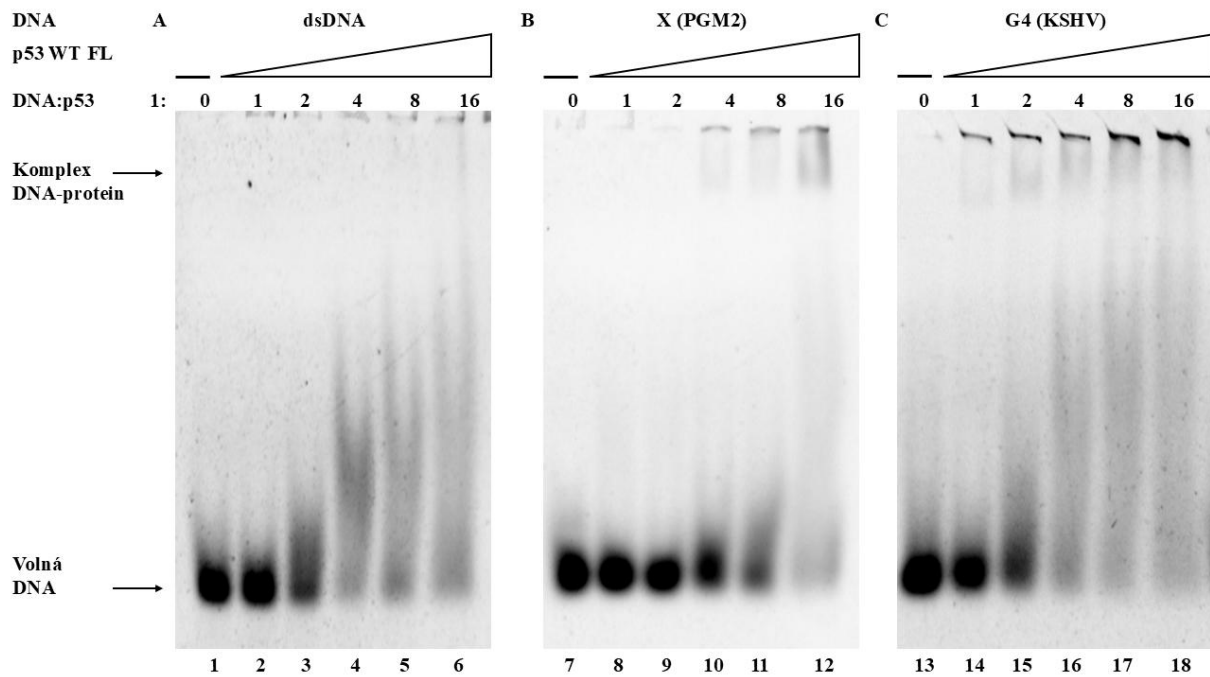
I když se zdálo, že dle snímku gelu po odbarvení (Obrázek 5.1.2) a nitrocelulózové membrány (Obrázek 5.1.5) bude nejnižší koncentrace vždy u p53-R175H, je patrné, že koncentrace v případě E4 a E5 je mírně vyšší než u p53-WT. Ovšem při E3 je koncentrace srovnatelná s mutantem R273H, který dosahoval nejlepších výsledků. Na odbarveném snímku R175H bylo předpovídáno, že se nebude nacházet žádný detekovatelný protein, ovšem na snímku nitrocelulózové membrány byl již band výrazný, což odpovídalo i stanovené koncentraci $0,571 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Naopak u snímku nitrocelulózové membrány p53-WT (Obrázek 5.1.4) byl nejvýraznější band v E6, ovšem ani odbarvení, ani stanovení koncentrace, tento trend neprokázalo. Koncentrace byla pouze $0,187 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejvyšší výtěžky dle předpokladu měl mutant R273H, který je obecně velmi stabilní. Koncentrace elucí E1 a E6 nebyly pro další experimenty využity z důvodu jejich nízkých hodnot u p53-WT a R175H. Pro další experimenty byly použity eluce E3 pro proteiny p53-WT a R273H a eluce E4 pro protein R175H.

5.2 Elektroforetické testy posunu mobility

Ke studiu vazby proteinu p53 a jeho mutantů *in vitro* k DNA s potenciálem tvorby různých sekundárních struktur DNA bylo využito elektroforetického testu posunu mobility (EMSA) pomocí dvouvrstvého polyakrylamidového gelu s TE pufrém a 50 mM KCl. Vazebné experimenty vycházely z interakce hybridizovaných FAM značených oligonukleotidů s proteiny izolovanými a charakterizovány dle předešlé kapitoly.

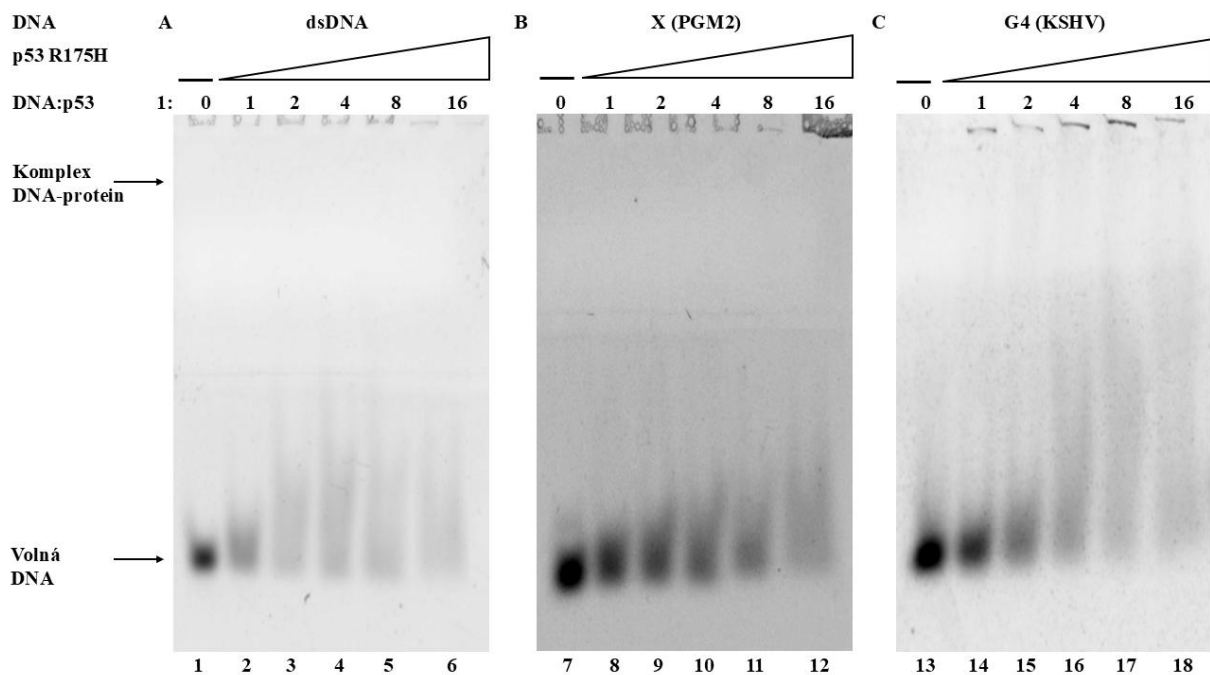
Vazebné experimenty byly provedeny se vzorky elucí E3 (WT a R273H), nebo E4 (R175H), které měly dle charakterizace stanovení nejvyšší koncentrace daných proteinů bez nežádoucí fragmentace. V případě interakce proteinu s fluorescenčně značeným oligonukleotidem se vazba projevuje jako úbytek volné DNA a tvorbou komplexu DNA:protein [139]. Na obrázcích 5.2.1 až 5.2.3 jsou vidět výsledky výskytu volné DNA a DNA v komplexu s proteiny. Protein p53 standardního typu (nebo jeho mutanti R175H a R273H) byl smíchán s dvouřetězcovou DNA v molárním poměru DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16, dále ve stejném poměru byly smíchány s PGM2, tvořící křížové struktury v DNA, a nakonec byly smíchány s oligonukleotidem KSHV tvořící G-kvadruplexové struktury.

Obrázek 5.2.1 dokládá interakci jednotlivých DNA s proteinem p53-WT. Ze snímku je patrné, že komplex proteinu p53WT s dsDNA se tvoří již při molárním poměru 1:2, ale charakter pásů v gelu naznačuje nespecifickou vazbu. Pravděpodobně způsobenou velikostí duplexu, u křížových struktur tvořených v DNA se tento komplex vytváří již při poměru 1:4 a vazba ukazuje na specifickou interakci. V případě G-kvadruplexu se komplex vytvoří už molárního poměru 1:2 a opět poukazuje na specifickou vazbu. V molárním poměru DNA:protein 1:16 se již neobjevuje volná DNA u žádné z DNA a tvoří se převážně komplexy.



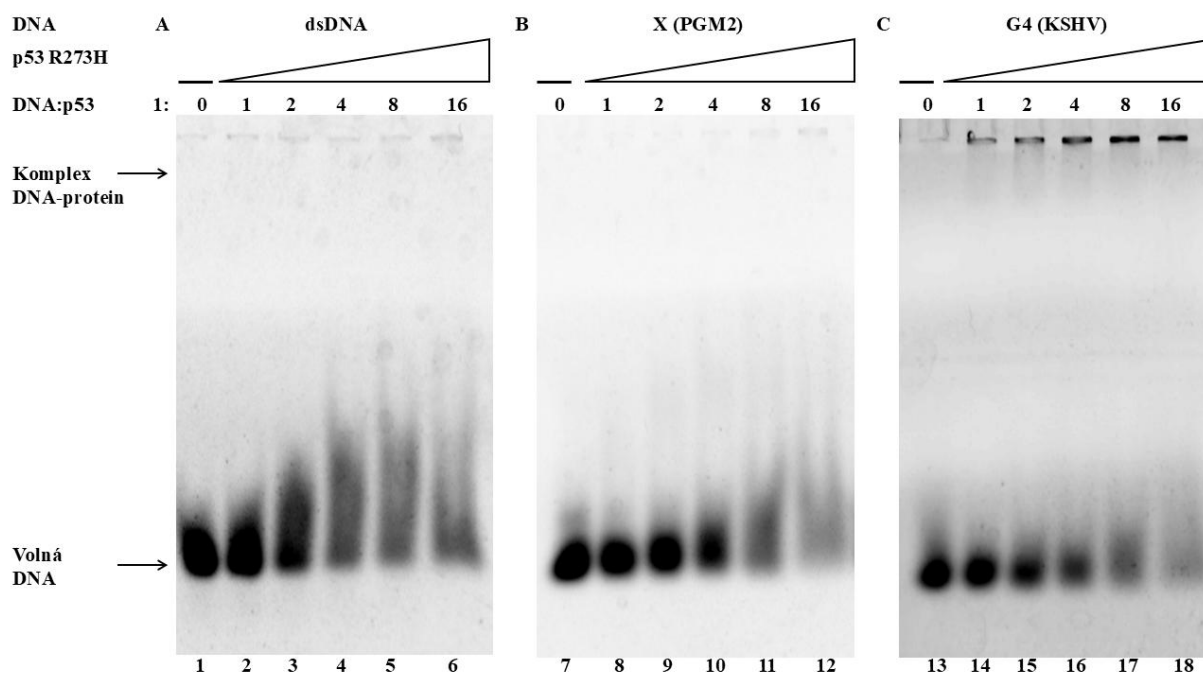
Obrázek 5.2.1: Vazebné experimenty proteinu p53-WT v nativním polyakrylamidovém gelu. Snímky byly pořizeny z různých gelů. Šipka vespod označuje výskyt volné DNA. Šipka nahoře značí místo výskytu komplexu DNA-protein. Jamky 1, 7 a 13 obsahují volnou DNA (fluorescenčně značený oligonukleotid) bez proteinu. (A) Starty 2–6 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-WT v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8 a 1:16. (B) Starty 8–12 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-WT v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16. (C) Starty 14–18 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-WT v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16.

Obrázek 5.2.2 s vazbu mezi mutantní formou p53 R175H a různými typy DNA ukazuje výrazně nižší afinitu R175H oproti WT proteinu. Komplex v případě dsDNA nebyl na gelu patrný ani v poměru 1:16, i když již zcela vymizela volná DNA (k úbytku docházelo již při molárním poměru DNA:protein 1:2). V případě křížových struktur se komplex DNA:protein začíná tvořit v poměru již 1:1 a volná DNA kompletně vymizela při poměru 1:16. Nicméně nelze prokázat o jaký typ vazeb se jedná, protože opět nebyly na gelu patrné signály v oblasti, kde byly proteinové komplexy očekávány. U sekvence s tvorbou G-kvadruplexu se ovšem objevuje komplex již v poměru 1:1 (viditelné i v jamce gelu), jak tomu bylo i v případě p53WT a volná DNA v poměru 1:16 zcela vymizí.



Obrázek 5.2.2: Vazebné experimenty proteinu p53-R175H v nativním polyakrylamidovém gelu. Snímky byly pořízeny z různých gelů. Šipka vespod označuje výskyt volné DNA. Šipka nahoře značí místo výskytu komplexu DNA-protein. Jamky 1, 7 a 13 obsahují volnou DNA (fluorescenčně značený oligonukleotid) bez proteinu. (A) Starty 2–6 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-R175H v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4 a 1:8 a 1:16. (B) Starty 8–12 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-R175H v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16. (C) Starty 14–18 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-R175H v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16.

Interakci mutantní formy p53-R273H vyobrazuje obrázek 5.2.3. R273H s dsDNA a křížovou strukturou DNA vykazuje tvorbu komplexu v poměru 1:8, zatímco s DNA s potenciálem tvorby G-kvadruplexu se komplex R273H s DNA tvoří stejně jako u p53-R175H již v poměru 1:1. Největší afinitu k vazbě na dsDNA vykazoval překvapivě mutant R175H a poté p53-WT s nespecifickou vazbou následovaný mutantem R273H s blíže necharakterizovanou vazbou. Nicméně charakter komplexů nebyl jasně rozlišen, což poukazuje spíše na nespecifickou vazbu. V případě křížové struktury vykazoval nejvyšší vazbu mutant R175H, následovaný proteiny WT a R273H. Nejvyšší afinitu k vazbě G4 DNA tedy vykazuje p53-WT, dále mutant R175H, a nakonec mutant R273H. Nižší afinita k vazbě na DNA je u mutantů dána pravděpodobně tím, že u nich dochází k mutaci v oblasti DBD, která ovlivňuje vazbu na DNA.



Obrázek 5.2.3: Vazebné experimenty proteinu p53-R273H v nativním polyakrylamidovém gelu. Snímky byly pořízeny z různých gelů. Šipka vespod označuje výskyt volné DNA. Šipka nahoře značí místo výskytu komplexu DNA-protein. Jamky 1, 7 a 13 obsahují volnou DNA (fluorescenčně značený oligonukleotid) bez proteinu. (A) Starty 2–6 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-R273H v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16. (B) Starty 8–12 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-R273H v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16. (C) Starty 14–18 obsahují DNA s rostoucí koncentrací proteinu p53-R273H v molárních poměrech DNA:protein 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16.

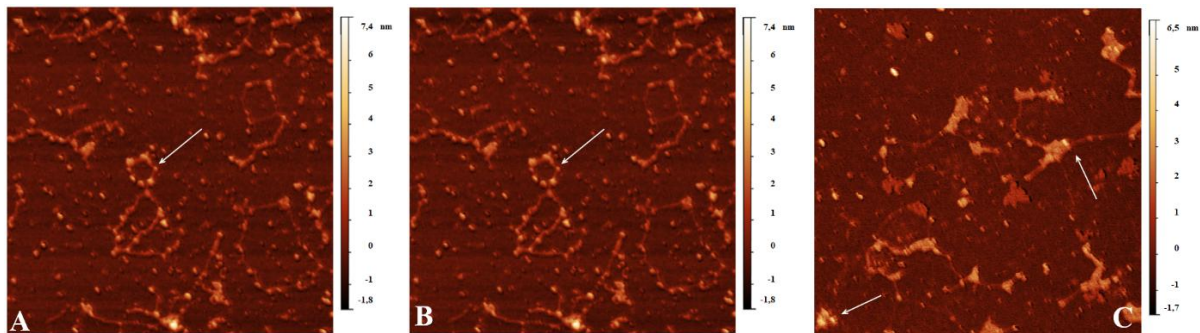
5.3 Mikroskopie atomárních sil

Pomocí mikroskopie atomárních sil byla analyzována vazba p53 standardního a jeho mutantních forem na různé struktury DNA. Protože dosud využívané oligonukleotidy byly příliš malé pro zobrazení, byly využity plazmidy, které obsahovaly inkorporované sekundární struktury. Jako model klasické dsDNA byl použit plazmid pBluescript SKII (-) s negativním nadšroubovicovým vinutím, které mělo podporovat formování lokálních nekanonických struktur. Pro křížovou strukturu byl využit plazmid pBluescript PGM2 a jako modelová struktura G-kvadruplexu byl použit pBluescript 3GC. Byly vyhotoveny snímky všech zkoumaných struktur DNA pro p53-WT i pro mutanty p53-R175H a p53-R273H.

Obrázek 5.3.1 zobrazuje přirozeně se vyskytující protein p53-WT vázaný na vybrané sekundární struktury DNA. Jak je z obrázku patrné, protein p53-WT vázal DNA bez ohledu na sekundární strukturu, přestože ani jeden z použitých plazmidů neobsahoval konsenzuální sekvenci pro vazbu proteinu p53. Vazba p53-WT na křížové struktury a struktury G-kvadruplexů byla v minulosti potvrzena [5] a v případě sekundárních struktur G-kvadruplexů byla prokázána dokonce schopnost proteinu strukturu G4 stabilizovat [140], jak potvrdily experimenty spektroskopie cirkulárního dichroismu s paralelním G4, odvozeným od promotoru genu *MYC* [5]. Dle této studie bylo dokázáno, že p53 se selektivně váže na struktury v oblasti promotoru *MYC*, zatímco na stejnou sekvenci ve dvoušroubovicové formě se neváže,

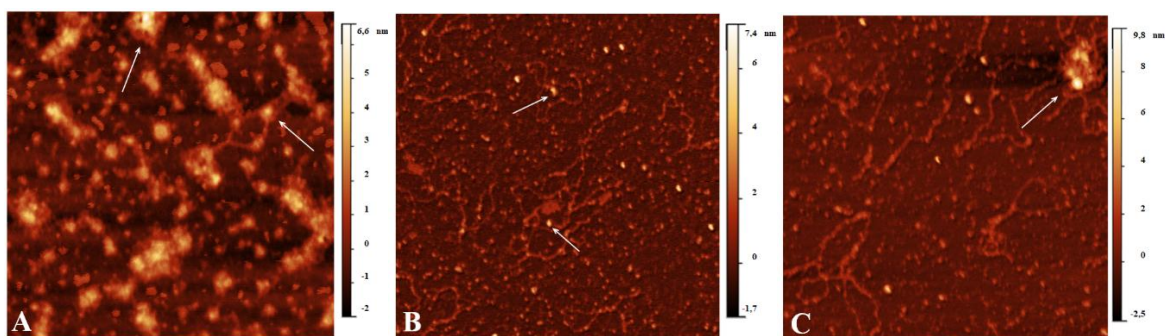
což ukazuje na jeho schopnost rozpoznávat sekundární struktury DNA. Tyto interakce jsou zprostředkovány především C-terminální doménou p53 a zůstávají zachovány u „hot spot“ mutantů, což značí, že vazba na G4 je nezávislá na DBD doméně a může přispívat k deregulaci genové exprese u mutantních forem. Naše výsledky podporují silný význam C-terminálního konce pro vazbu p53 na DNA. Zdá se, že p53 dokáže kromě rozpoznání sekvenčně specifických míst vazby rozpoznávat i nekanonické struktury DNA a tato vlastnost zůstává zachována i u jeho mutantních forem. Lze tedy usuzovat, že vazba proteinu p53 na DNA je silně závislá na topologii DNA.

Oproti vazbě proteinu ke křížové struktuře nebo struktuře G-kvadruplexu, ovšem vazba p53-WT na dsDNA neukazuje na specifickou vazbu, která by byla dána v jednom bodě. Nicméně působí spíše jako vícenásobná vazba proteinu podél kostry pDNA, což by mohlo poukazovat na nesespecifickou vazbu proteinu, danou vlivem interakce C-terminální domény p53 a nikoliv DBD, která rozeznává právě konsenzuální sekvence v DNA [141].



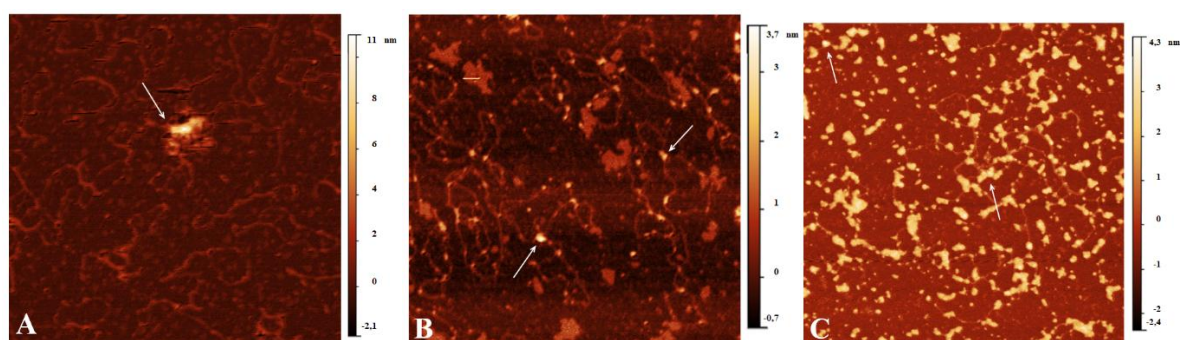
Obrázek 5.3.1: Vazba proteinu p53-WT na vybrané struktury DNA. Protein p53-WT byl smíchán s 200 ng DNA plazmidu pBluescript (A), pBluescript PGM2 (B) a pBluescript 3GC (C), které představovaly vazbu proteinu na dsDNA, křížovou strukturu a strukturu G-kvadruplexu. Bíle jsou označena místa vazby proteinu na DNA.

Na Obrázku 5.3.2 je zachycena interakce mutovaného proteinu p53-R175H při vazbě na různé sekundární struktury. Stejně jako v případě proteinu standardního typu i zde byla patrná vazba proteinu na vybrané sekundární struktury i bez přítomnosti konsenzuální sekvence důležité pro vazbu DBD proteinu p53. Přesto jsou na snímcích zachyceny rozdílné vazebné mechanismy. Protein p53-R175H vázal dsDNA opět skrze nesespecifické interakce, které mohly být dány vlivem působení C-terminální domény. Vazba p53-R175H ke křížovým strukturám oproti tomu naznačuje specifickou vazbu proteinu a projevila se bodovými místy. Nejzajímavější vazebný mechanismus byl pozorován při interakci p53-R175H k sekundárním strukturám G-kvadruplexu, kdy bylo pozorováno ohnisko proteinu navázané na pDNA, které ukazuje na nesespecifickou vazbu a možnou oligomerizaci proteinu, která byla viděna např. i u proteinu IFI16 při vazbě na dsDNA bez tvorby G-kvadruplexu [142].



Obrázek 5.3.2: Vazba mutantního proteinu p53-R175H na vybrané struktury DNA. Protein p53-R175H byl smíchán s 200 ng DNA plazmidu pBluescript (A), pBluescript PGM2 (B) a pBluescript 3GC (C), které představovaly vazbu proteinu na dsDNA, křížovou strukturu a strukturu G-kvadruplexu. Bíle jsou označena místa vazby proteinu na DNA.

Na Obrázku 5.3.3 je zachycena vazba proteinu p53-R273H na vybrané struktury DNA. Stejně jako v případě proteinů p53-WT a p53-R175H i mutovaná varianta p53-R273H interagovala se všemi vzorky pDNA s rozdílným mechanismem vazby. Zatímco v případě dsDNA i struktury G4 docházelo pravděpodobně k vazbě proteinu nespecifickým způsobem, vazba proteinu p53-R273H naznačuje specifickou vazbu na křížové struktury.



Obrázek 5.3.3: Vazba mutantního proteinu p53-R273H na vybrané struktury DNA. Protein p53 byl smíchán s 200 ng DNA plazmidu pBluescript (A), pBluescript PGM2 (B) a pBluescript 3GC (C), které představovaly vazbu proteinu na dsDNA, křížovou strukturu a strukturu G-kvadruplexu. Bíle jsou označena místa vazby proteinu na DNA.

Výsledky získané pomocí mikroskopie atomárních sil potvrdil výsledky vazebných experimentů, které prokázaly vazbu proteinu ke všem vybraným strukturám DNA. Nespecifická vazba proteinů p53 byla přitom dána nejen konkrétním typem proteinu, ale i danou sekundární strukturou a ukázala na složitý vazebný model, ve kterém není vazba proteinů p53 zprostředkována pouze DNA vazebnou doménou, ale může být dána i působením C-terminální domény p53. Vliv C-terminální domény na vazbu proteinu k DNA byl v minulosti nejen potvrzen, ale ukázalo se, že protein plné délky je schopen účinně vázat DNA pouze v přítomnosti C-terminální domény [143].

5.4 Luciferázové reportérové testy

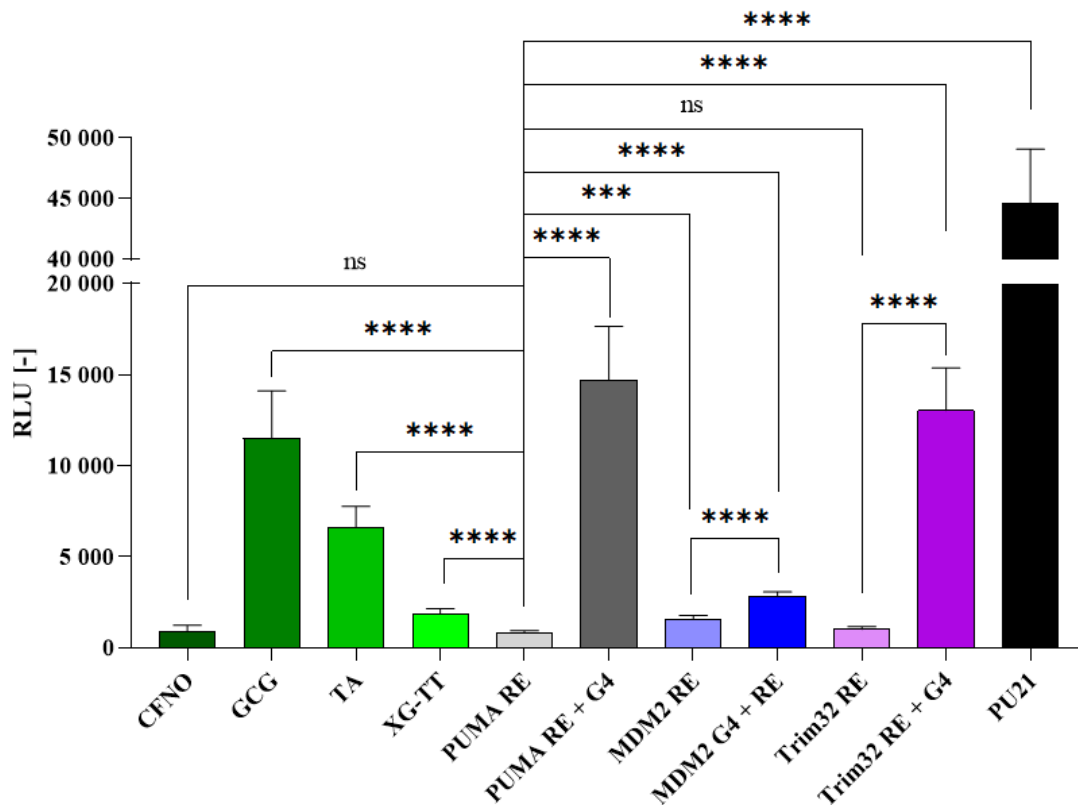
S využitím luciferázových reportérových testů byla v isogenním kvasinkovém systému sledována bazální aktivita jednotlivých kmenů a *in vivo* vazebná a transkripčně-aktivační aktivita vybraných proteinů p53. Ke studiu byl využit kvasinkový systém nesoucí specificky mutovanou oblast na kvasinkovém chromozomu XV, která je lokalizována před (*upstream*) vůči minimálnímu kvasinkovému promotoru *pCYC1* a sekvenci pro expresi enzymu luciferázy kódovanou genem *LUC1* [144]. Pro experimenty byly vybrány yLFM kvasinkové kmeny, obsahující sekvence s potenciálem tvorby různých sekundárních struktur. Křížové struktury CFNO, GCG, XA, XG-TT [145]. Sekvence s potenciálem tvorby G-kvadruplexu PU21 a sekvence odvozené z vybraných genů *BBC3* (PUMA), *MDM2* a *TRIM32*, odvozené dle nativního uspořádání (obsahující RE a sekvenci s potenciálem tvorby G4), nebo jejich kontrolní sekvence, nesoucí pouze RE a kontrolní CT_n sekvenci substituující případnou sekvenci pro tvorbu G-kvadruplexu. U kvasinkových kmenů byla cílová sekvence potvrzena pomocí PCR a následného Sangerova sekvenování. Charakterizace jednotlivých sekvencí je uvedena v tabulce 5.4.1 v kapitole *EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST*.

Nejprve byl sledován vliv sekvence s potenciálem pro tvorbu různých sekundárních struktur na bazální transkripci reportérového genu. Experimenty sledovaly účinek různých sekundárních struktur DNA na bazální transkripční aparát, jehož transkripční aktivita by mohla být podpořena přítomností sekvencí s potenciálem tvorby G4 [146]. Vybrané kvasinkové kmeny byly transformovány prázdnými vektory pRS314 a pRS315 pro vhodnou selekci (bez tvorby proteinu rodiny p53) lithium-acetátovou metodou a následně byla sledována aktivita bazálního transkripčního aparátu jako signál bioluminiscence normalizován na optickou hustotu kultury (RLU; z angl. Relative Light Unit). Výsledky získané z alespoň tří měření jsou vyneseny na obrázku 5.4.1. K určení statistické významnosti byl využit Studentův t-test vůči kontrolnímu kmeni PUMA RE, u kterého byla pozorována v minulosti minimální hladina bazální aktivity [146].

Zatímco transformanty GCG, XA a XG-TT, tvořící křížové struktury, vykazovaly nárůst bazální aktivity oproti kmeni PUMA RE, u kmene CFNO, tvořící taktéž křížovou strukturu, byla zaznamenána hodnota bazální aktivity srovnatelná s aktivitou PUMA RE, která se i na základě statistického vyhodnocení projevila jako nesignifikantní změna. U transformantů kmenů PUMA, MDM2 a TRIM32, obsahujících pouze responzivní elementy (RE bez G4), byla sledovaná bazální aktivita výrazně nižší oproti stejným sekvencím s RE, v přítomnosti sekvence náchylné k tvorbě G-kvadruplexu, nicméně v kmeni MDM2 RE docházelo ke zvýšení bazální aktivity oproti PUMA RE. Zvýšení bazální aktivity bylo rovněž pozorováno u kmene PU21 se sekvencí, tvořící potenciálně pouze strukturu G4 bez RE proteinu p53.

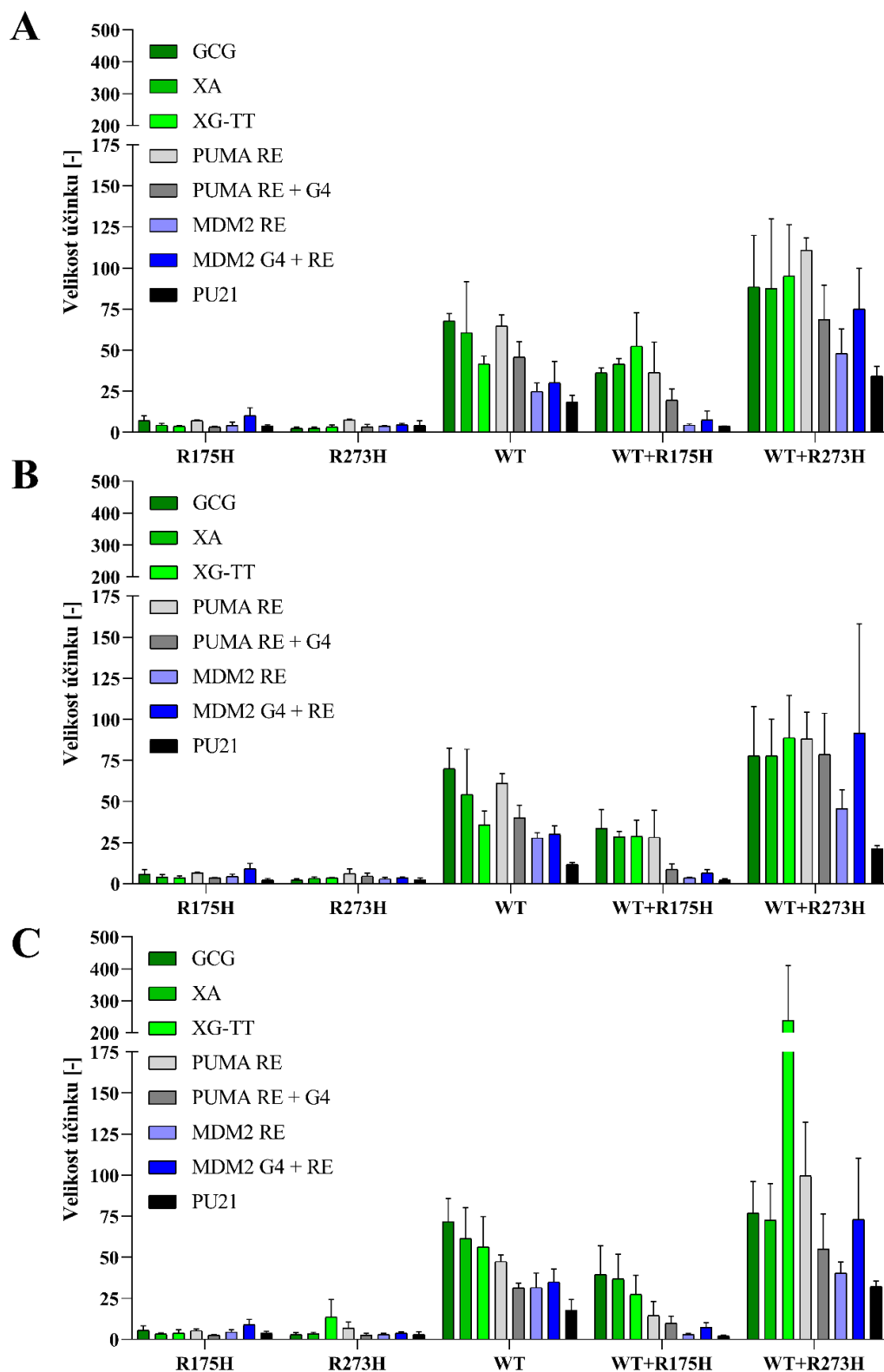
Na základě těchto výsledků byly pro sledování indukované transkripční aktivity proteinů p53 (WT a mutanty R175H a R273H) vybrány kmeny GCG, XA, XG-TT, PUMA RE, PUMA RE + G4, MDM2 RE, MDM2 RE + G4 a PU21. Kmeny odvozené z genu *TRIM32* nebyly dále sledovány, protože jsou strukturně podobné jako kmeny PUMA (G4 umístěn za RE proteinu p53) a kmen CFNO nebyl zařazen, protože se u něj nevyskytla zvýšená bazální aktivita. Vybrané kmeny byly transformovány plazmidy pro expresi proteinu p53 WT s konstitutivním

promotorem, nebo mutovaných proteinů p53 R175H a R273H s galaktózou inducibilním *GAL1,10* promotorem. Oba mutanty p53 jsou známy úplnou ztrátou biologické funkce [147].



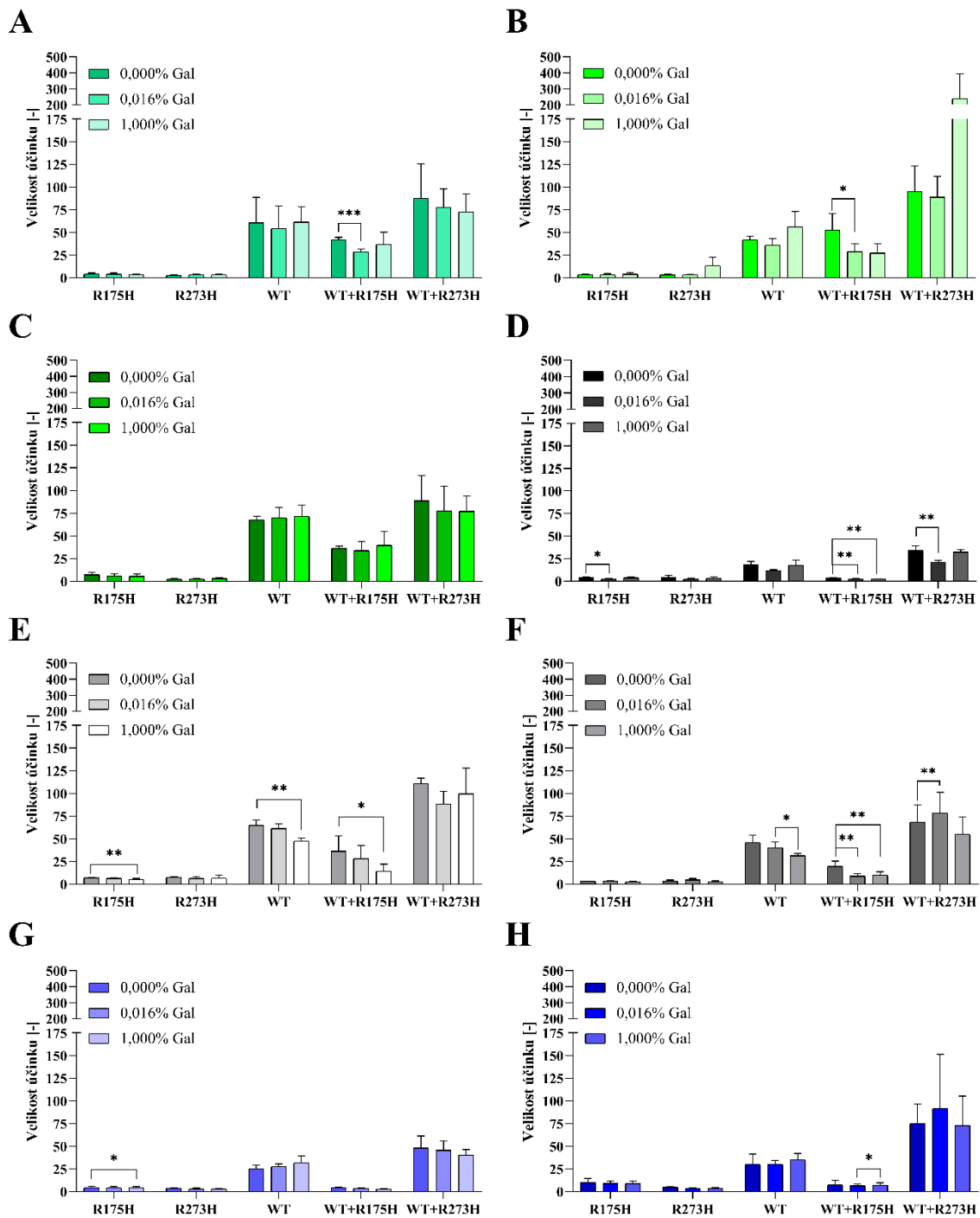
Obrázek 5.4.1: Bazální transkripční aktivita vybraných kvasinkových kmenů. Bazální aktivita byla měřena v *yLFM* kvasinkových buňkách transformovaných plazmidy *pRS314* a *pRS315* nesoucími prázdný vektor bez exprese proteinů rodiny p53 v čase T6 (6 hodin od začátku kultivace) v médiu obsahujícím 0,000 % galaktózy. Statistický význam byl určen na základě Studentova t-testu. Hladina významnosti $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$ je značena jako *, **, *** a ****. ns = nespecifická změna bazální aktivity.

Na obrázku 5.4.2 je vyjádřena transkripční aktivita proteinů p53 WT, R175H, R273H a koexprese proteinů WT s oběma mutanty v médiu obsahujícím 0,000; 0,016 a 1,000 % galaktózy. Data byla přepočtena vůči velikosti prázdného vektoru a uvádějí násobek transkripční aktivity vůči prázdným vektorům jednotlivých kmenů. Jak je z výsledků patrné, většina transformantů nevykazuje významné zvýšení či snížení transkripční aktivity v závislosti na rozdílné koncentraci galaktózy. Výjimku tvoří XG-TT, kde je patrný nárůst transkripční aktivity v médiu obsahujícím 1,000 % galaktózy u mutantu R273H. Což může být dáno tím, že p53 R273H je protein, který rozpoznává DNA na základě její konformace a přednostně se váže na nekanonické struktury DNA a podporuje rozpoznávání této oblasti pro obecný transkripční aparát kvasinek, oproti mutantu R175H, který se váže velmi slabě [148]. Obecně byla prokázána ztráta transkripční aktivity u mutantů R175H a R273H, která se projevila nízkou naměřenou hodnotou velikosti účinku (nízkou hodnotou změny transkripční aktivity vůči prázdnému vektoru).



Obrázek 5.4.2: Transkripční aktivita samotných proteinů p53 WT, p53-R175H, p53-R273H a proteinu standardního typu (WT) v koexpresi s mutanty R175H a R273H uvedená jako velikost účinku. Trans-aktivační účinek proteinů byl měřen v selektivním médiu obsahujícím 0,000 % (A), 0,016 % (B) a 1,000 % (C) galaktózy.

Obrázek 5.4.3 představuje transkripční aktivitu jednotlivých transformantů v závislosti na rozdílné koncentraci galaktózy. Pro kmen obsahující palindrom GCG není zřetelný dominantně negativní účinek, protože koexprimované mutanty (WT+R175H a WT+R273H) nevykazují výrazný pokles vůči WT (přirozeně se vyskytující protein). Dle předpokladu, samotní mutanti mají minimální aktivitu. Aktivita WT+R273H je relativně vysoká, což může být dáno přednostní vazbou kanonických struktur DNA proteinem p53, bez vlivu mutovaného proteinu. V kvasinkovém kmeni, obsahujícím palindrom XA, také není patrný dominantně negativní účinek koexprimovaných mutantů pro žádnou s koncentrací galaktózy. Naopak je zde výrazný nárůst transkripční aktivity u všech koncentrací pro konstrukt WT+R273H, který je nejvýraznější při 1 % obsahu galaktózy v médiu. V kmeni obsahujícím XG-TT by se mohlo hovořit o negativním efektu mutantu na aktivitu proteinu standardního typu v případě konstruktu WT+R273H, protože s rostoucí koncentrací galaktózy (tedy i rostoucí expresí mutované varianty p53) docházelo ke snížení transkripční aktivity, která ovšem nedosahovala statisticky významného rozdílu. Pro PU21 je patrná nízká transkripční aktivita i v porovnání s ostatními transformanty, což je zajímavé, protože tento kmen byl vybrán z důvodu potenciální tvorby G4, který by podle předešlých studií měl být minimální [149]. Konstrukt WT+R175H má podobnou transkripční aktivitu jako samotný mutant R175H, tedy velmi nízkou až minimální. I zde má WT+R273H vyšší transkripční aktivitu než WT. Obrázek 5.4.3 E, zobrazuje transkripční aktivitu naměřenou v kmeni PUMA s responsivním elementem. Proteiny p53 WT i WT v koexpresi s mutantem R175H vykazují snížení transkripční aktivity při 1,000% koncentraci galaktózy. Ani zde není viditelný dominantně negativní efekt, naopak WT+R273H vykazuje mírně vyšší nebo stejnou míru transkripční aktivity. Obrázek 5.4.3 F pro PUMA RE se sekvencí náchylnou k tvorbě G-kvadruplexu prokázal možný dominantně negativní efekt při koexpresi WT+R175H vůči WT. Nicméně transkripční aktivita WT+R273H neprokázala stejný trend a s 0,016% koncentrací galaktózy dosahovala vyšší aktivity, než samotný p53 WT při koncentraci galaktózy 0,000 % (tedy bez exprese mutantu). Obrázek 5.4.3 G ukazuje výsledky naměřené v kmeni MDM2 RE. Zde WT obecně vykazuje velmi nízkou aktivitu a konstrukt WT+R175H má transkripční aktivitu dokonce menší, než samotný mutant R175H, který kvůli ztrátě funkce vykazoval nízkou až zanedbatelnou transkripční aktivitu. Transkripční aktivita WT+R273H je mírně vyšší oproti WT. Obrázek 5.4.3 H znázorňuje výsledky pro poslední kmen (MDM2 RE se sekvencí náchylnou k tvorbě G-kvadruplexu), kde je transkripční aktivita obecně vyšší než v grafu G, z čehož by se dalo vyvozovat, že potenciální tvorba G-kvadruplexů zvyšuje v tomto případě transkripční aktivitu. Ovšem trend koncentrací, který byl viděn v obrázku G, nekoreluje s trendem, který je vidět v obrázku H. I zde je obecně nižší transkripční aktivita WT a konstrukt WT+R175H vykazuje podobnou transkripční aktivitu jako mutant R175H. Výrazně vyšší transkripční aktivitu oproti WT má konstrukt WT+R273H. Nižší transkripční aktivita proteinů u kmenů obsahujících navíc sekvenci s vyšší pravděpodobností tvorby G-kvadruplexu (oproti kmenům nesoucí pouze RE) je dána pravděpodobně právě přítomností G-kvadruplexů, které fungují jako represory transkripce, jak bylo popsáno v některých předešlých studiích [146, 150]. I přes vyšší bazální aktivitu, naměřenou u prázdných vektorů (viz Obrázek 5.4.1), proteiny s úplnou ztrátou funkce nemohou výrazně zvyšovat nebo inhibovat aktivitu proteinu standardního typu.



Obrázek 5.4.3: Transkripční aktivita vybraných proteinů rodiny p53 vypočtená jako velikost účinku. Trans-aktivační účinek vybraných proteinů (exprimovaných samostatně nebo v koexpressi) naměřených v yLFM kvasinkových kmenech GCG (A), XA (B), XG-TT (C), PU21 (D), PUMA RE (E), PUMA RE+G4 (F), MDM2 RE (G) a MDM2 RE+G4 (H) byl sledován v čase T6 (6 hodin od začátku inkubace) v médiu obsahujícím 0,000 %, 0,016 % a 1,000 % galaktózy. Statistický význam byl určen na základě Studentova t-testu. Hladina významnosti $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$ je značena jako *, **, *** a ****. ns = nespecifická změna bazální aktivity.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce byla, izolace a purifikace proteinu p53 a jeho mutantních variant R175H a R273H z bakteriálního expresního systému. V rámci dalších experimentů bylo třeba proteiny izolovat v co nejčistší formě a v co nejvyšším množství. Všechny proteiny byly izolovány v plné délce a s pouze velmi nízkým zastoupením fragmentů, což bylo prokázáno pomocí SDS-PAGE a imunodetekce.

Vazebné vlastnosti proteinů byly sledovány pomocí vazebných experimentů metodou elektroforetického testu posunu mobility (EMSA). Proteiny byly inkubovány s oligonukleotidy dsDNA, PGM2, KSHV se sekvencemi responzivních elementů (CFNO, GCG, XA, XG-TT, PUMA RE, PUMA RE + G4, MDM2 RE, MDM2 RE + G4, Trim32 RE, Trim32 RE + G4, PU21) v molárních poměrech (1:1; 1:2; 1:4; 1:8 a 1:16). Všechny varianty proteinu p53 se navázaly na studované struktury. Nejvyšší afinitu u křížových struktur vykazoval mutant R175H, u dsDNA a G-kvadruplexů se nejvíce navázal přirozeně se vyskytující typ proteinu (WT). Nižší afinita k vazbě u mutantních forem by mohla být dána mutací ve vazebné doméně, která ovlivňuje vazbu na DNA.

Dále byla vazba proteinů analyzována pomocí AFM, u kterého muselo být přistoupeno k použití plazmidů místo dosud využívaných oligonukleotidů, které jsou pro tuto metodu příliš malé. Všechny proteiny se úspěšně navázaly na všechny studované struktury, i když žádný z plazmidů neobsahoval sekvenci pro vazbu proteinu p53, což je nejspíše způsobeno tím, že tyto interakce zajišťuje C-terminální doména, která je zachována i u mutantních forem a dokáže rozpoznávat různé sekundární struktury. Z toho vyplývá, že vazba proteinu p53 i jeho mutantů je silně závislá na konformaci DNA. Toto tvrzení podporuje i vazba na dsDNA, která nevykazuje, že by se mělo jednat o specifickou vazbu, ale spíše o několikanásobnou vazbu kolem pDNA, která by mohla být dána vlivem interakcí C-terminální doménou. Dosavadní výsledky poukazují na velmi složitý vazebný model p53 na DNA, který není dán pouze DBD doménou, ale též C-terminální doménou a k jeho lepšímu celkovému pochopení by bylo třeba dalších studií.

Dále byl sledován vliv interakcí vybraných proteinů s různými strukturami DNA na biologickou aktivitu těchto proteinů prostřednictvím luciferázových reportérových testů. Experimenty byly provedeny v isogenním kvasinkovém systému a byla při nich sledována bazální aktivita jednotlivých kmenů a následná celková transkripční aktivita vybraných proteinů v jednotlivých kmenech. Výsledky testů bazální aktivity prokázaly, že nejen sekvence s potenciálem tvorby G-kvadruplexů, ale rovněž některé palindromatické sekvence s potenciálem tvorby křížových struktur, mohou zvyšovat transkripční aktivitu bazálního expresního systému (exprese reportérového genu nebyla indukována proteiny rodiny p53). Přestože byla u vybraných mutantů potvrzena vazba na vybrané sekundární struktury, většina transformantů s koexpresí mutantů a proteinu standardního typu nevykazovala výrazné snížení, či zvýšení transkripční aktivity, a to ani při zvýšené koncentraci galaktózy, indukující vyšší exprese mutantu. V experimentech nebyl pozorován ani jiný trend, z čehož lze vyvozovat, že proteiny s úplnou ztrátou funkce nemohou tedy výrazně inhibovat nebo zvyšovat aktivitu přirozeně se vyskytujícího proteinu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. [online]. [vid. 2026-04-19]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.76.5.2420
- [2] HOLLSTEIN, Monica, David SIDRANSKY, Bert VOGELSTEIN a Curtis C. HARRIS. p53 Mutations in Human Cancers. *Science* [online]. 1991, **253**(5015), 49–53. Dostupné z: doi:10.1126/science.1905840
- [3] HELTON, E. Scott a Xinbin CHEN. p53 modulation of the DNA damage response. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2007, **100**(4), 883–896. ISSN 1097-4644. Dostupné z: doi:10.1002/jcb.21091
- [4] HASEGAWA, H., Y. YAMADA, H. IHA, K. TSUKASAKI, K. NAGAI, S. ATOGAMI, K. SUGAHARA, K. TSURUDA, A. ISHIZAKI a S. KAMIHIRA. Activation of p53 by Nutlin-3a, an antagonist of MDM2, induces apoptosis and cellular senescence in adult T-cell leukemia cells. *Leukemia* [online]. 2009, **23**(11), 2090–2101. ISSN 1476-5551. Dostupné z: doi:10.1038/leu.2009.171
- [5] PETR, Marek, Robert HELMA, Alena POLÁŠKOVÁ, Aneta KREJČÍ, Zuzana DVORÁKOVÁ, Iva KEJNOVSKÁ, Lucie NAVRÁTILOVÁ, Matej ADÁMIK, Michaela VORLÍČKOVÁ a Marie BRÁZDOVÁ. Wild-type p53 binds to MYC promoter G-quadruplex. *Bioscience Reports* [online]. 2016, **36**(5), e00397. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20160232
- [6] KRATOCHVILOVÁ, Libuše, Alessandra DINOVÁ, Natália VALKOVÁ, Michaela DOBROVOLNÁ, Pedro A. SÁNCHEZ-MURCIA a Václav BRÁZDA. Chromatin Immunoprecipitation Reveals p53 Binding to G-Quadruplex DNA Sequences in Myeloid Leukemia Cell Lines. *ACS Bio & Med Chem Au* [online]. 2025, **5**(2), 283–298. ISSN 2694-2437. Dostupné z: doi:10.1021/acsbiochemau.4c00124
- [7] JAGELSKÁ, Eva B., Hana PIVOŇKOVÁ, Miroslav FOJTA a Václav BRÁZDA. The potential of the cruciform structure formation as an important factor influencing p53 sequence-specific binding to natural DNA targets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2010, **391**(3), 1409–1414. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.076
- [8] SEN, Dipankar a Walter GILBERT. Formation of Parallel Four-Stranded Complexes by Guanine-Rich Motifs in DNA and Its Implications for Meiosis. *Nature*. 1988, **334**(6180), 364–6. ISSN 00280836.
- [9] GENNA, Vito, Guillem PORTELLA, Alba SALA, Montserrat TERRAZAS, Israel SERRANO-CHACÓN, Javier GONZÁLEZ, Núria VILLEGAS, Lidia MATEO, Chiara CASTELLAZZI, Mireia LABRADOR, Anna AVIÑO, Adam HOSPITAL, Albert GANDIOSO, Patrick ALOY, Isabelle BRUN-HEATH, Carlos GONZALEZ, Ramon ERITJA a Modesto OROZCO. Systematic study of hybrid triplex topology and stability suggests a general triplex-mediated regulatory mechanism. *Nucleic Acids Research* [online]. 2025, **53**(5), gkaf170. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaf170
- [10] CRAWFORD, J L, F J KOLPAK, A H WANG, G J QUIGLEY, J H VAN BOOM, G VAN DER MAREL a A RICH. The tetramer d(CpGpCpG) crystallizes as a left-handed double helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1980, **77**(7), 4016–4020. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.77.7.4016
- [11] KURAHASHI, Hiroki, Hidehito INAGAKI, Kouji YAMADA, Tamae OHYE, Mariko TANIGUCHI, Beverly S. EMANUEL a Tatsushi TODA. Cruciform DNA Structure Underlies the Etiology for Palindrome-mediated Human Chromosomal Translocations *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2004, **279**(34), 35377–35383. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M400354200

- [12] SEN, Dipankar a Walter GILBERT. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* [online]. 1988, **334**(6180), 364–366. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/334364a0
- [13] SUNDQUIST, Wesley I. a Aaron KLUG. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* [online]. 1989, **342**(6251), 825–829. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/342825a0
- [14] WILLIAMSON, James R., M. K. RAGHURAMAN a Thomas R. CECH. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* [online]. 1989, **59**(5), 871–880. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(89)90610-7
- [15] GARG, Rohini, Jyoti AGGARWAL a Bijal THAKKAR. Genome-wide discovery of G-quadruplex forming sequences and their functional relevance in plants. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 28211. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep28211
- [16] ZHANG, Xiaojuan, Lijun XIANG, Jin LI, Qili FENG a Kangkang NIU. G-quadruplex structure in plants and insects and potential applications in pest control. *Crop Health* [online]. 2025, **3**(1), 8. ISSN 2948-1945. Dostupné z: doi:10.1007/s44297-025-00047-2
- [17] TIAN, Tian, Yu-Qi CHEN, Shao-Ru WANG a Xiang ZHOU. G-Quadruplex: A Regulator of Gene Expression and Its Chemical Targeting. *Chem* [online]. 2018, **4**(6), 1314–1344. ISSN 2451-9294, 2451-9308. Dostupné z: doi:10.1016/j.chempr.2018.02.014
- [18] PATEL, Dinshaw J., Anh Tuân PHAN a Vitaly KURYAVYI. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(22), 7429–7455. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm711
- [19] BURGE, Sarah, Gary N. PARKINSON, Pascale HAZEL, Alan K. TODD a Stephen NEIDLE. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(19), 5402–5415. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl655
- [20] WEBBA DA SILVA, Mateus. Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chemistry – A European Journal* [online]. 2007, **13**(35), 9738–9745. ISSN 1521-3765. Dostupné z: doi:10.1002/chem.200701255
- [21] BERTINI, Luca, Valeria LIBERA, Sara CATALINI, Giorgio SCHIRÒ, Andrea ORECCHINI, Renzo CAMPANELLA, Valentina ARCIUOLO, Bruno PAGANO, Caterina PETRILLO, Cristiano DE MICHELE, Lucia COMEZ a Alessandro PACIARONI. Hindered intermolecular stacking of anti-parallel telomeric G-quadruplexes. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2024, **161**(10), 105101. ISSN 0021-9606. Dostupné z: doi:10.1063/5.0225371
- [22] BURGE, Sarah, Gary N. PARKINSON, Pascale HAZEL, Alan K. TODD a Stephen NEIDLE. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research* [online]. 2006, **34**(19), 5402–5415. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl655
- [23] ZHANG, Sulin, Yanling WU a Wen ZHANG. G-Quadruplex Structures and Their Interaction Diversity with Ligands. *ChemMedChem* [online]. 2014, **9**(5), 899–911. ISSN 1860-7187. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.201300566
- [24] KAWAUCHI, Keiko, Ryoto URANO, Natsuki KINOSHITA, Shin KUWAMOTO, Takeru TORII, Yoshiki HASHIMOTO, Shinya TANIGUCHI, Mitsuki TSURUTA a Daisuke MIYOSHI. Photosensitizers Based on G-Quadruplex Ligand for Cancer Photodynamic Therapy. *Genes* [online]. 2020, **11**(11) [vid. 2026-04-27]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11111340
- [25] BIDZINSKA, Joanna, Graziella CIMINO-REALE, Nadia ZAFFARONI a Marco FOLINI. G-Quadruplex Structures in the Human Genome as Novel Therapeutic Targets.

- Molecules* [online]. 2013, **18**(10), 12368–12395. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules181012368
- [26] LAM, Enid Yi Ni, Dario BERALDI, David TANNAHILL a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature Communications* [online]. 2013, **4**(1), 1796. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms2792
- [27] WU, Yuliang a Robert M. BROSH JR. G-quadruplex nucleic acids and human disease. *The FEBS Journal* [online]. 2010, **277**(17), 3470–3488. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07760.x
- [28] HUPPERT, J. L. Hunting G-quadruplexes. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), Targeting DNA Part II, 1140–1148. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.01.014
- [29] HUPPERT, Julian L. a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(2), 406–413. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl1057
- [30] CONOMOS, Dimitri, Hilda PICKETT a Roger REDDEL. Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture. *Frontiers in Oncology* [online]. 2013, **3** [vid. 2026-02-15]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2013.00027
- [31] WANG, Yong a Dinshaw J. PATEL. Solution structure of the Tetrahymena telomeric repeat d(T2G4)₄ G-tetraplex. *Structure* [online]. 1994, **2**(12), 1141–1156. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/S0969-2126(94)00117-0
- [32] JANSSONOVÁ, Linnea I., Jendrik HENTSCHEL, Josef W. PARKY, Terren R. CHANG, Cheng LU, Rishika BARAL, Clive R. BAGSHAW a Michael D. KÁMEN. Telomere DNA G-quadruplex folding within actively extending human telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2019, **116**(19), 9350–9359. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1814777116
- [33] HARLEY, Calvin B., A. Bruce FUTCHER a Carol W. GREIDER. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* [online]. 1990, **345**(6274), 458–460. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/345458a0
- [34] HEALY, K C. Telomere dynamics and telomerase activation in tumor progression: prospects for prognosis and therapy. *Oncology research*. 1995, **7**(3–4), 121–130. ISSN 1555-3906.
- [35] DAI, Jixun, Megan CARVER, Chandanamali PUNCHIHEWA, Roger A. JONES a Danzhou YANG. Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(15), 4927–4940. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm522
- [36] DAI, Jixun, Chandanamali PUNCHIHEWA, Attila AMBRUS, Ding CHEN, Roger A. JONES a Danzhou YANG. Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(7), 2440–2450. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm009
- [37] RISITANO, Antonina a Keith R. FOX. Stability of Intramolecular DNA Quadruplexes: Comparison with DNA Duplexes. *Biochemistry* [online]. 2003, **42**(21), 6507–6513. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi026997v
- [38] DINOI, Federico, Simona MARZANO, Maria Ilaria MARINO, Eleonora VERTECCHI, Carlo Maria D'ANGELO, Carmen MARESCA, Eleonora PETTI, Roberto DINAMI, Angela RIZZO, Annamaria BIROCCIO, Stefano CACCHIONE, Bruno PAGANO, Erica SALVATI a Jussara AMATO. Modulating TERRA G-quadruplexes with ligands: impact on telomeric DNA:RNA hybrids and ALT mechanisms. *Nucleic Acids Research* [online]. 2025, **53**(22), gkaf1300. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaf1300

- [39] HENDERSON, Alexander, Yuliang WU, Yu Chuan HUANG, Elizabeth A. CHAVEZ, Jesse PLATT, F. Brad JOHNSON, Robert M. BROSH, Dipankar SEN a Peter M. LANSDORP. Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, **42**(2), 860–869. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt957
- [40] HUPPERT, J. L. Hunting G-quadruplexes. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), Targeting DNA Part II, 1140–1148. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.01.014
- [41] SIDDIQUI-JAIN, Adam, Cory L. GRAND, David J. BEARSS a Laurence H. HURLEY. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(18), 11593–11598. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.182256799
- [42] CHEN, Luying, Jonathan DICKERHOFF, Saburo SAKAI a Danzhou YANG. DNA G-Quadruplex in Human Telomeres and Oncogene Promoters: Structures, Functions, and Small Molecule Targeting. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2022, **55**(18), 2628–2646. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.2c00337
- [43] SIDDIQUI-JAIN, Adam, Cory L. GRAND, David J. BEARSS a Laurence H. HURLEY. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(18), 11593–11598. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.182256799
- [44] VENNSTROM, B, D SHEINESS, J ZABIELSKI a J M BISHOP. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *Journal of Virology* [online]. 1982, **42**(3), 773–779. Dostupné z: doi:10.1128/jvi.42.3.773-779.1982
- [45] SCHIRRIPA, Marta, Floriana NAPPO, Chiara CREMOLINI, Lisa SALVATORE, Daniele ROSSINI, Maria BENSI, Gianluca BUSINELLO, Filippo PIETRANTONIO, Giovanni RANDON, Giovanni FUCÀ, Alessandra BOCCACCINO, Francesca BERGAMO, Sara LONARDI, Angelo Paolo DEI TOS, Matteo FASSAN a Fotios LOUPAKIS. KRAS G12C Metastatic Colorectal Cancer: Specific Features of a New Emerging Target Population. *Clinical Colorectal Cancer* [online]. 2020, **19**(3), 219–225. ISSN 1938-0674. Dostupné z: doi:10.1016/j.clcc.2020.04.009
- [46] KOUKOURAKIS, Michael I, Alexandra GIATROMANOLAKI, Efthimios SIVRIDIS, Constantinos SIMOPOULOS, Helen TURLEY, Kate TALKS, Kevin C GATTER a Adrian L HARRIS. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* [online]. 2002, **53**(5), 1192–1202. ISSN 0360-3016. Dostupné z: doi:10.1016/S0360-3016(02)02848-1
- [47] MARTIN, Cathie a Javier PAZ-ARES. MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* [online]. 1997, **13**(2), 67–73. ISSN 0168-9525. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-9525(96)10049-4
- [48] BALASUBRAMANIAN, Shankar, Laurence H. HURLEY a Stephen NEIDLE. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nature reviews. Drug discovery* [online]. 2011, **10**(4), 261–275. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd3428
- [49] AMBRUS, Attila, Ding CHEN, Jixun DAI, Roger A. JONES a Danzhou YANG. Solution Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex Element in the Human c-MYC Promoter. Implications for G-Quadruplex Stabilization. *Biochemistry* [online]. 2005, **44**(6), 2048–2058. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi048242p
- [50] HOWELL, R. M., K. J. WOODFORD, M. N. WEITZMANN a K. USDIN. The Chicken β -Globin Gene Promoter Forms a Novel “Cinched” Tetrahelical Structure (*). *Journal of*

- Biological Chemistry* [online]. 1996, **271**(9), 5208–5214. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.271.9.5208
- [51] HUPPERT, J. L. Hunting G-quadruplexes. *Biochimie* [online]. 2008, **90**(8), Targeting DNA Part II, 1140–1148. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2008.01.014
- [52] SIDDIQUI-JAIN, Adam, Cory L. GRAND, David J. BEARSS a Laurence H. HURLEY. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(18), 11593–11598. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.182256799
- [53] VALTON, Anne-Laure, Vahideh HASSAN-ZADEH, Ingrid LEMA, Nicole BOGGETTO, Patrizia ALBERTI, Carole SAINTOMÉ, Jean-François RIOU a Marie-Noëlle PRIOLEAU. G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators. *The EMBO Journal* [online]. 2014, **33**(7), 732–746. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1002/embj.201387506
- [54] PROROK, Paulina, Marie ARTUFEL, Antoine AZE, Philippe COULOMBE, Isabelle PEIFFER, Laurent LACROIX, Aurore GUÉDIN, Jean-Louis MERGNY, Julia DAMASCHKE, Aloys SCHEPERS, Christelle CAYROU, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Benoit BALLESTER a Marcel MÉCHALI. Involvement of G-quadruplex regions in mammalian replication origin activity. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1), 3274. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-11104-0
- [55] HUPPERT, Julian Leon, Anthony BUGAUT, Sunita KUMARI a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(19), 6260–6268. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn511
- [56] PERRIAUD, Laury, Virginie MARCEL, Charlotte SAGNE, Vincent FAVAUDON, Aurore GUÉDIN, Aurore DE RACHE, Corinne GUETTA, Florian HAMON, Marie-Paule TEULADE-FICHO, Pierre HAINAUT, Jean-Louis MERGNY a Janet HALL. Impact of G-quadruplex structures and intronic polymorphisms rs17878362 and rs1642785 on basal and ionizing radiation-induced expression of alternative p53 transcripts. *Carcinogenesis* [online]. 2014, **35**(12), 2706–2715. ISSN 0143-3334. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/bgu206
- [57] MARZANO, Simona, Gabriella PINTO, Anna DI PORZIO, Jussara AMATO, Antonio RANDAZZO, Angela AMORESANO a Bruno PAGANO. Identifying G-quadruplex-interacting proteins in cancer-related gene promoters. *Communications Chemistry* [online]. 2025, **8**(1), 64. ISSN 2399-3669. Dostupné z: doi:10.1038/s42004-025-01462-w
- [58] HUANG, Hao, Ke XIAO, Zhenchang WANG, Wenyong ZHU, Yu GU a Xiao SUN. G-quadruplex structures are transcriptional regulatory hubs of super-enhancers. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2026, **339**, 150074. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.150074
- [59] ZHANG, Ze-Hao, Zi-Yan WANG, Cong-Hui LI, Sheng Hu QIAN, Wen ZHANG a Zhen-Xia CHEN. Mammalian conservation of endogenous G-quadruplex reveals their associations with complex traits. *Genome Biology* [online]. 2025, **26**(1), 262. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-025-03750-z
- [60] HUPPERT, Julian L. a Shankar BALASUBRAMANIAN. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research* [online]. 2005, **33**(9), 2908–2916. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gki609
- [61] FREES, Scott, Camille MENENDEZ, Matt CRUM a Paramjeet S. BAGGA. QGRS-Conserve: a computational method for discovering evolutionarily conserved G-quadruplex motifs. *Human Genomics* [online]. 2014, **8**(1), 8. ISSN 1479-7364. Dostupné z: doi:10.1186/1479-7364-8-8

- [62] BRÁZDA, Václav, Richard P. BOWATER, Petr PEČINKA a Martin BARTAS. mGem: Noncanonical nucleic acid structures—powerful but neglected antiviral targets. *mBio* [online]. nedatováno, **16**(11), e02730-25. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mbio.02730-25
- [63] SATO, Koichi, Nerea MARTIN-PINTADO, Harm POST, Maarten ALTELAAR a Puck KNIPSCHEER. Multistep mechanism of G-quadruplex resolution during DNA replication. *Science Advances* [online]. 2021, **7**(39), eabf8653. Dostupné z: doi:10.1126/sciadv.abf8653
- [64] SPIEGEL, Jochen, Sergio Martínez CUESTA, Santosh ADHIKARI, Robert HÄNSELHERTSCH, David TANNAHILL a Shankar BALASUBRAMANIAN. G-quadruplexes are transcription factor binding hubs in human chromatin. *Genome Biology* [online]. 2021, **22**(1), 117. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-021-02324-z
- [65] FARHATH, Mohamed M., Matthew THOMPSON, Sujay RAY, Abby SEWELL, Hamza BALCI a Soumitra BASU. G-Quadruplex-Enabling Sequence within the Human Tyrosine Hydroxylase Promoter Differentially Regulates Transcription. *Biochemistry* [online]. 2015, **54**(36), 5533–5545. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.5b00209
- [66] BROSH, Robert M. a Sharon B. CANTOR. Molecular and cellular functions of the FANCD1 DNA helicase defective in cancer and in Fanconi anemia. *Frontiers in Genetics* [online]. 2014, **5** [vid. 2026-03-20]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2014.00372
- [67] LEE, Wei Ting C., Yandong YIN, Michael J. MORTEN, Peter TONZI, Pam Pam GWO, Diana C. ODERMATT, Mauro MODESTI, Sharon B. CANTOR, Kerstin GARI, Tony T. HUANG a Eli ROTHENBERG. Single-molecule imaging reveals replication fork coupled formation of G-quadruplex structures hinders local replication stress signaling. *Nature Communications* [online]. 2021, **12**(1), 2525. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-22830-9
- [68] TANG, Jun, Zhong-yuan KAN, Yuan YAO, Quan WANG, Yu-hua HAO a Zheng TAN. G-quadruplex preferentially forms at the very 3' end of vertebrate telomeric DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2008, **36**(4), 1200–1208. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm1137
- [69] JANSSON, Linnea I., Jendrik HENTSCHEL, Joseph W. PARKS, Terren R. CHANG, Cheng LU, Rishika BARAL, Clive R. BAGSHAW a Michael D. STONE. Telomere DNA G-quadruplex folding within actively extending human telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2019, **116**(19), 9350–9359. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1814777116
- [70] ZÄHLER, Alan M., James R. WILLIAMSON, Thomas R. CECH a David M. PRESCOTT. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* [online]. 1991, **350**(6320), 718–720. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/350718a0
- [71] KOMŮRKOVÁ, Denisa, Alena Svobodová KOVAŘÍKOVÁ a Eva BÁRTOVÁ. G-Quadruplex Structures Colocalize with Transcription Factories and Nuclear Speckles Surrounded by Acetylated and Dimethylated Histones H3. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(4) [vid. 2026-03-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22041995
- [72] LYAMICHEV, Victor I., Igor G. PANYUTIN a V. Yu KLISHKO. Kinetics of Cruciform Formation and Stability of Cruciform Structure in Superhelical DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 1984, **1**(6), 1311. ISSN 0739-1102. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.1984.10507522

- [73] COUREY, Albert J. a James C. WANG. Cruciform formation in a negatively supercoiled DNA may be kinetically forbidden under physiological conditions. *Cell* [online]. 1983, **33**(3), 817–829. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(83)90024-7
- [74] AIT SAADA, Anissia, Wenying GUO, Alex B COSTA, Jiaxin YANG, Jianrong WANG a Kirill S LOBACHEV. Widely spaced and divergent inverted repeats become a potent source of chromosomal rearrangements in long single-stranded DNA regions. *Nucleic Acids Research* [online]. 2023, **51**(8), 3722–3734. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkad153
- [75] KATO, Mikio, Shingo HOKABE, Shuji ITAKURA, Shinsei MINOSHIMA, Yuri L. LYUBCHENKO, Theodor D. GURKOV, Hiroshi OKAWARA, Kuniaki NAGAYAMA a Nobuyoshi SHIMIZU. Interarm Interaction of DNA Cruciform Forming at a Short Inverted Repeat Sequence. *Biophysical Journal* [online]. 2003, **85**(1), 402–408. ISSN 0006-3495, 1542-0086. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(03)74484-1
- [76] ZANNIS-HADJOPOULOS, M., L. FRAPPIER, M. KHOURY a G. B. PRICE. Effect of anti-cruciform DNA monoclonal antibodies on DNA replication. *The EMBO Journal* [online]. 1988, **7**(6), 1837–1844. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1002/j.1460-2075.1988.tb03016.x
- [77] BRÁZDA, Václav, Jana ČECHOVÁ, Michele BATTISTIN, Jan COUFAL, Eva B. JAGELSKÁ, Ivan RAIMONDI a Alberto INGA. The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2017, **483**(1), 516–521. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.113
- [78] BOWATER, Richard P., Natália BOHÁLOVÁ a Václav BRÁZDA. Interaction of Proteins with Inverted Repeats and Cruciform Structures in Nucleic Acids. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(11) [vid. 2026-04-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23116171
- [79] JOERGER, Andreas C. a Alan R. FERSHT. Structural Biology of the Tumor Suppressor p53 and Cancer-Associated Mutants. In: *Advances in Cancer Research* [online]. B.m.: Academic Press, 2007 [vid. 2024-11-28], s. 1–23. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-230X(06)97001-8
- [80] KWAN, Calvin, Omar CASTRO-SANDOVAL, Christian GAIDDON a Tim STORR. Inhibition of p53 protein aggregation as a cancer treatment strategy. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2023, **72**, 102230 [vid. 2024-11-18]. ISSN 1367-5931. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2022.102230
- [81] KRSTIC, Jelena, Isabel REINISCH, Michael SCHUPP, Tim J. SCHULZ a Andreas PROKESCH. p53 Functions in Adipose Tissue Metabolism and Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(9), 2622. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19092622
- [82] LI, Qingliang, Rezaul M. KARIM, Mo CHENG, Mousumi DAS, Lihong CHEN, Chen ZHANG, Harshani R. LAWRENCE, Gary W. DAUGHDRILL, Ernst SCHONBRUNN, Haitao JI a Jiandong CHEN. Inhibition of p53 DNA binding by a small molecule protects mice from radiation toxicity. *Oncogene* [online]. 2020, **39**(29), 5187–5200. ISSN 0950-9232. Dostupné z: doi:10.1038/s41388-020-1344-y
- [83] YANG, Annie, Mourad KAGHAD, Yunmei WANG, Emily GILLET, Mark D. FLEMING, Volker DÖTSCH, Nancy C. ANDREWS, Daniel CAPUT a Frank MCKEON. p63, a p53 Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Molecular Cell* [online]. 1998, **2**(3), 305–316. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(00)80275-0
- [84] MELINO, Gerry, Xin LU, Milena GASCO, Tim CROOK a Richard A KNIGHT. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends in Biochemical*

- Sciences* [online]. 2003, **28**(12), 663–670 [vid. 2024-12-02]. ISSN 0968-0004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2003.10.004
- [85] STIEWE, Thorsten. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2007, **7**(3), 165–167 [vid. 2024-12-02]. ISSN 1474-175X, 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2072
- [86] YANG, Annie, Mourad KAGHAD, Daniel CAPUT a Frank MCKEON. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends in Genetics* [online]. 2002, **18**(2), 90–95 [vid. 2024-12-02]. ISSN 01689525. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-9525(02)02595-7
- [87] BELL, Stefan, Christian KLEIN, Lin MÜLLER, Silke HANSEN a Johannes BUCHNER. p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2002, **322**(5), 917–927. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-2836(02)00848-3
- [88] KROIS, Alexander S., H. Jane DYSON a Peter E. WRIGHT. Long-range regulation of p53 DNA binding by its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2018, **115**(48), E11302–E11310. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1814051115
- [89] JOERGER, Andreas C. a Alan R. FERSHT. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2008, **77**, 557–582. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.77.060806.091238
- [90] *A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1* [online]. [vid. 2025-09-10]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.94.9.4675
- [91] DUMONT, Patrick, J. I-Ju LEU, Anthony C. DELLA PIETRA, Donna L. GEORGE a Maureen MURPHY. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics* [online]. 2003, **33**(3), 357–365. ISSN 1546-1718. Dostupné z: doi:10.1038/ng1093
- [92] TAN, Yaw Sing, Yasmina MHOUMADI a Chandra S VERMA. Roles of computational modelling in understanding p53 structure, biology, and its therapeutic targeting. *Journal of Molecular Cell Biology* [online]. 2019, **11**(4), 306–316. ISSN 1674-2788. Dostupné z: doi:10.1093/jmcb/mjz009
- [93] WEI, Chia-Lin, Qiang WU, Vinsensius B. VEGA, Kuo Ping CHIU, Patrick NG, Tao ZHANG, Atif SHAHAB, How Choong YONG, YuTao FU, Zhiping WENG, JianJun LIU, Xiao Dong ZHAO, Joon-Lin CHEW, Yen Ling LEE, Vladimir A. KUZNETSOV, Wing-Kin SUNG, Lance D. MILLER, Bing LIM, Edison T. LIU, Qiang YU, Huck-Hui NG a Yijun RUAN. A Global Map of p53 Transcription-Factor Binding Sites in the Human Genome. *Cell* [online]. 2006, **124**(1), 207–219. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2005.10.043
- [94] CHEN, C Y, J D OLINER, Q ZHAN, A J FORNACE, B VOGELSTEIN a M B KASTAN. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1994, **91**(7), 2684–2688. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.7.2684
- [95] DEHART, Caroline J., Jasdave S. CHAHAL, S. J. FLINT a David H. PERLMAN. Extensive Post-translational Modification of Active and Inactivated Forms of Endogenous p53*. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2014, **13**(1), 1–17. ISSN 1535-9476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M113.030254
- [96] BRÁZDA, Václav a Jan COUFAL. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(2), 375. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms18020375

- [97] NAKANO, Katsunori a Karen H. VOUSDEN. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell* [online]. 2001, 7(3), 683–694. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(01)00214-3
- [98] MCHENRY, Matthew W., Peiwen SHI, Christina M. CAMARA, Daniel T. COHEN, T. Justin RETTENMAIER, Utsarga ADHIKARY, Micah A. GYGI, Ka YANG, Steven P. GYGI, Thomas E. WALES, John R. ENGEN, James A. WELLS a Loren D. WALENSKY. Covalent inhibition of pro-apoptotic BAX. *Nature Chemical Biology* [online]. 2024, 20(8), 1022–1032. ISSN 1552-4469. Dostupné z: doi:10.1038/s41589-023-01537-6
- [99] GANESH, Venkateswaran, Yochana KANCHERLA, Cassim M. IGRAM, Andrew J. PUGELY, Aliasger K. SALEM, Kyungsup SHIN, Tae-Hong LIM a Dongrim SEOL. Pharmacotherapies to prevent epidural fibrosis after laminectomy: a systematic review of in vitro and in vivo animal models. *The Spine Journal* [online]. 2023, 23(10), 1471–1484. ISSN 1529-9430. Dostupné z: doi:10.1016/j.spinee.2023.05.007
- [100] *Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis* | *Science* [online]. [vid. 2026-03-27]. Dostupné z: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.288.5468.1053>
- [101] NAKANO, Katsunori a Karen H. VOUSDEN. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Molecular Cell* [online]. 2001, 7(3), 683–694. ISSN 1097-2765. Dostupné z: doi:10.1016/S1097-2765(01)00214-3
- [102] CHEN, Yongheng, Xiaojun ZHANG, Ana Carolina DANTAS MACHADO, Yuan DING, Zhuchu CHEN, Peter Z. QIN, Remo ROHS a Lin CHEN. Structure of p53 binding to the BAX response element reveals DNA unwinding and compression to accommodate base-pair insertion. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, 41(17), 8368–8376. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt584
- [103] KLANOVA, Magdalena a Pavel KLENER. BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers* [online]. 2020, 12(4), 938. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12040938
- [104] WEI, Hudie, Lingzhi QU, Shuyan DAI, Yun LI, Haolan WANG, Yilu FENG, Xiaojuan CHEN, Longying JIANG, Ming GUO, Jun LI, Zhuchu CHEN, Lin CHEN, Ye ZHANG a Yongheng CHEN. Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Nature Communications* [online]. 2021, 12, 2280. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-22655-6
- [105] ARBELY, Eyal, Eviatar NATAN, Tobias BRANDT, Mark D. ALLEN, Dmitry B. VEPRINTSEV, Carol V. ROBINSON, Jason W. CHIN, Andreas C. JOERGER a Alan R. FERSHT. Acetylation of lysine 120 of p53 endows DNA-binding specificity at effective physiological salt concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, 108(20), 8251–8256. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1105028108
- [106] NARASIMHA, Anil M, Manuel KAULICH, Gary S SHAPIRO, Yoon J CHOI, Piotr SICINSKI a Steven F DOWDY. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife* [online]. 2014, 3, e02872. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.02872
- [107] EI-DEIRY, Wafik S, J Wade HARPER, Patrick M O'CONNOR, Victor E VELCULESCU, Christine E CANMAN, Joany JACKMAN, Jennifer A PIETENPOL, Marilee BURRELL, David E HILL, Yisong WANG, Klas G WIMAN, W Edward MERCER, Michael B KASTAN, Kurt W KOHN, Stephen J ELLEDGE, Kenneth W KINZLER a Bert VOGELSTEIN. WAF1/CIP1 Is Induced in p53-mediated G1 Arrest and Apoptosis. nedatováno.
- [108] SCHMITT, Clemens A., Jordan S. FRIDMAN, Meng YANG, Soyoung LEE, Eugene BARANOV, Robert M. HOFFMAN a Scott W. LOWE. A Senescence Program

- Controlled by p53 and p16INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy. *Cell* [online]. 2002, **109**(3), 335–346. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(02)00734-1
- [109] HINKAL, George, Neha PARIKH a Lawrence A. DONEHOWER. Timed Somatic Deletion of p53 in Mice Reveals Age-Associated Differences in Tumor Progression. *PLOS ONE* [online]. 2009, **4**(8), e6654. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0006654
- [110] MENENDEZ, Daniel, Alberto INGA a Michael A. RESNICK. The expanding universe of p53 targets. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2009, **9**(10), 724–737. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc2730
- [111] BECKERMAN, Rachel a Carol PRIVES. Transcriptional Regulation by P53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, **2**(8), a000935. ISSN , 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a000935
- [112] VOUSDEN, Karen H. a Carol PRIVES. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* [online]. 2009, **137**(3), 413–431. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.04.037
- [113] XU, Jie, Joke REUMERS, José R. COUCEIRO, Frederik DE SMET, Rodrigo GALLARDO, Stanislav RUDYAK, Ann CORNELIS, Jef ROZENSKI, Aleksandra ZWOLINSKA, Jean-Christophe MARINE, Diether LAMBRECHTS, Young-Ah SUH, Frederic ROUSSEAU a Joost SCHYMKOWITZ. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nature Chemical Biology* [online]. 2011, **7**(5), 285–295. ISSN 1552-4469. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.546
- [114] HSIAO, M., J. LOW, E. DORN, D. KU, P. PATTENGAL, J. YEARGIN a M. HAAS. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *The American Journal of Pathology*. 1994, **145**(3), 702–714. ISSN 0002-9440.
- [115] DITTMER, Dirk, Sibani PATI, Gerard ZAMBETTI, Shelley CHU, Angelika K. TERESKY, Mary MOORE, Cathy FINLAY a Arnold J. LEVINE. Gain of function mutations in p53. *Nature Genetics* [online]. 1993, **4**(1), 42–46. ISSN 1546-1718. Dostupné z: doi:10.1038/ng0593-42
- [116] VOUSDEN, Karen H. a Xin LU. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2002, **2**(8), 594–604. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc864
- [117] VIKHANSKAYA, Faina, Mobin M. SIDDIQUE, Ming KEI LEE, Massimo BROGGINI a Kanaga SABAPATHY. Evaluation of the Combined Effect of p53 Codon 72 Polymorphism and Hotspot Mutations in Response to Anticancer Drugs. *Clinical Cancer Research* [online]. 2005, **11**(12), 4348–4356. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1547
- [118] BARGONETTI, Jill, Paula N. FRIEDMAN, Scott E. KERN, Bert VOGELSTEIN a Carol PRIVES. Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* [online]. 1991, **65**(6), 1083–1091. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(91)90560-L
- [119] KERN, KINZLER, BRUSKIN, JAROSZ a Al ET. Identification of p53 as a Sequence-Specific DNA-Binding Protein. *Science* [online]. 1991 [vid. 2026-02-16]. Dostupné z: doi:10.1126/science.2047879
- [120] YUE, Xuétian, Yuhao ZHAO, Yang XU, Min ZHENG, Zhaohui FENG a Wenwei HU. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *Journal of molecular biology* [online]. 2017, **429**(11), 1595–1606. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2017.03.030

- [121] MILNER, Jo a E. A. MEDCALF. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* [online]. 1991, **65**(5), 765–774. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(91)90384-B
- [122] WILLIS, Amy, Eun Joo JUNG, Therese WAKEFIELD a Xinbin CHEN. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* [online]. 2004, **23**(13), 2330–2338. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1207396
- [123] BAKER, Suzanne J., Antonette C. PREISINGER, J. Milburn JESSUP, Christos PARASKEVA, Sanford MARKOWITZ, J. K. V. WILLSON, Stanley HAMILTON a Bert VOGELSTEIN. p53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis1. *Cancer Research*. 1990, **50**(23), 7717–7722. ISSN 0008-5472.
- [124] ALEXANDROVA, Evguenia M., Safia A. MIRZA, Sulan XU, Ramona SCHULZ-HEDDERGOTT, Natalia D. MARCHENKO a Ute M. MOLL. p53 loss-of-heterozygosity is a necessary prerequisite for mutant p53 stabilization and gain-of-function in vivo. *Cell Death & Disease* [online]. 2017, **8**(3), e2661–e2661. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2017.80
- [125] CHEN, Yongheng, Xiaojun ZHANG, Ana Carolina DANTAS MACHADO, Yuan DING, Zhuchu CHEN, Peter Z. QIN, Remo ROHS a Lin CHEN. Structure of p53 binding to the BAX response element reveals DNA unwinding and compression to accommodate base-pair insertion. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(17), 8368–8376. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt584
- [126] WEI, Chia-Lin, Qiang WU, Vinsensius B. VEGA, Kuo Ping CHIU, Patrick NG, Tao ZHANG, Atif SHAHAB, How Choong YONG, YuTao FU, Zhiping WENG, JianJun LIU, Xiao Dong ZHAO, Joon-Lin CHEW, Yen Ling LEE, Vladimir A. KUZNETSOV, Wing-Kin SUNG, Lance D. MILLER, Bing LIM, Edison T. LIU, Qiang YU, Huck-Hui NG a Yijun RUAN. A Global Map of p53 Transcription-Factor Binding Sites in the Human Genome. *Cell* [online]. 2006, **124**(1), 207–219. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2005.10.043
- [127] JORDAN, Jennifer J., Daniel MENENDEZ, Alberto INGA, Maher NOURREDINE, Douglas BELL a Michael A. RESNICK. Noncanonical DNA Motifs as Transactivation Targets by Wild Type and Mutant p53. *PLoS Genetics* [online]. 2008, **4**(6), e1000104. ISSN 1553-7390. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1000104
- [128] RAJAGOPALAN, Sridharan, Fang HUANG a Alan R. FERSHT. Single-Molecule characterization of oligomerization kinetics and equilibria of the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Research* [online]. 2011, **39**(6), 2294–2303. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq800
- [129] JEFFREY, Philip D., Svetlana GORINA a Nikola P. PAVLETICH. Crystal Structure of the Tetramerization Domain of the p53 Tumor Suppressor at 1.7 Angstroms. *Science* [online]. 1995, **267**(5203), 1498–1502. Dostupné z: doi:10.1126/science.7878469
- [130] STOMMEL, Jayne M., Natalie D. MARCHENKO, Gretchen S. JIMENEZ, Ute M. MOLL, Thomas J. HOPE a Geoffrey M. WAHL. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO Journal* [online]. 1999, **18**(6), 1660–1672. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/18.6.1660
- [131] GAGLIA, Giorgio, Yinghua GUAN, Jagesh V. SHAH a Galit LAHAV. Activation and control of p53 tetramerization in individual living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2013, **110**(38), 15497–15501. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1311126110

- [132] CHO, Yunje, Svetlana GORINA, Philip D. JEFFREY a Nikola P. PAVLETICH. Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science* [online]. 1994, **265**(5170), 346–355. Dostupné z: doi:10.1126/science.8023157
- [133] HOLLIDAY, Robin. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetics Research* [online]. 1964, **5**(2), 282–304. ISSN 1469-5073, 0016-6723. Dostupné z: doi:10.1017/S0016672300001233
- [134] LEE, Suman, Lora CAVALLO a Jack GRIFFITH. Human p53 Binds Holliday Junctions Strongly and Facilitates Their Cleavage *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997, **272**(11), 7532–7539. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.11.7532
- [135] SUBRAMANIAN, Deepa a Jack D. GRIFFITH. Interactions between p53, hMSH2–hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases. *Nucleic Acids Research* [online]. 2002, **30**(11), 2427–2434. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/30.11.2427
- [136] PALEČEK, Emil, Daniel VLK, Veronika STAŇKOVÁ, Václav BRÁZDA, Bořivoj VOJTĚŠEK, Tedd R. HUPP, Achim SCHAPER a Thomas M. JOVIN. Tumor suppressor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA. *Oncogene* [online]. 1997, **15**(18), 2201–2209. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1201398
- [137] HÁRONÍKOVÁ, Lucia, Jan COUFAL, Iva KEJNOVSKÁ, Eva B. JAGELSKÁ, Miroslav FOJTA, Petra DVOŘÁKOVÁ, Petr MULLER, Borivoj VOJTESEK a Václav BRÁZDA. IFI16 Preferentially Binds to DNA with Quadruplex Structure and Enhances DNA Quadruplex Formation. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(6), e0157156. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0157156
- [138] LÖÖKE, Marko, Kersti KRISTJUHAN a Arnold KRISTJUHAN. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* [online]. 2011, **50**(5), 325–328. ISSN 1940-9818. Dostupné z: doi:10.2144/000113672
- [139] CAREY, Michael F., Craig L. PETERSON a Stephen T. SMALE. Experimental Strategies for the Identification of DNA-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2012, **2012**(1), pdb.top067470. ISSN 1940-3402, 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top067470
- [140] *Nucleolin stabilizes G-quadruplex structures folded by the LTR promoter and silences HIV-1 viral transcription | Nucleic Acids Research | Oxford Academic* [online]. [vid. 2026-04-17]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article/43/18/8884/2414514?guestAccessKey=>
- [141] MELERO, Roberto, Sridharan RAJAGOPALAN, Melisa LÁZARO, Andreas C. JOERGER, Tobias BRANDT, Dmitry B. VEPRINTSEV, Gorka LASSO, David GIL, Sjors H. W. SCHERES, José María CARAZO, Alan R. FERSHT a Mikel VALLE. Electron microscopy studies on the quaternary structure of p53 reveal different binding modes for p53 tetramers in complex with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, **108**(2), 557–562. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1015520107
- [142] VALKOVÁ, Natália, Libuše KRATOCHVILOVÁ, Lucia MARTINKOVÁ a Václav BRÁZDA. Dual mode of IFI16 binding to supercoiled and linear DNA: A closer insight. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2023, **667**, 89–94. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2023.05.049
- [143] HAMARD, Pierre-Jacques, Dana J. LUKIN a James J. MANFREDI. p53 Basic C Terminus Regulates p53 Functions through DNA Binding Modulation of Subset of Target Genes*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012, **287**(26), 22397–22407. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.331298

- [144] MONTI, Paola, Bartolomeo BOSCO, Sara GOMES, Lucilia SARAIVA, Gilberto FRONZA a Alberto INGA. Yeast As a Chassis for Developing Functional Assays to Study Human P53. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)* [online]. 2019, (150), e59071. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/59071
- [145] BRÁZDA, Václav, Jana ČECHOVÁ, Michele BATTISTIN, Jan COUFAL, Eva B. JAGELSKÁ, Ivan RAIMONDI a Alberto INGA. The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2017, **483**(1), 516–521. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.113
- [146] KRATOCHVILOVÁ, Libuše, Matuš VOJSOVIČ, Natália VALKOVÁ, Lucie ŠISLEROVÁ, Zeinab EL RASHED, Alberto INGA, Paola MONTI a Václav BRÁZDA. The presence of a G-quadruplex prone sequence upstream of a minimal promoter increases transcriptional activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Reports* [online]. 2023, **43**(12), BSR20231348. ISSN 0144-8463. Dostupné z: doi:10.1042/BSR20231348
- [147] VADAKEKOLATHU, Jayakumar, David J. BOOCOOCK, Kirti PANDEY, Barbara-ann GUINN, Antoine LEGRAND, Amanda K. MILES, Clare COVENEY, Rochelle AYALA, Anthony W. PURCELL a Stephanie E. MCARDLE. Multi-Omic Analysis of Two Common P53 Mutations: Proteins Regulated by Mutated P53 as Potential Targets for Immunotherapy. *Cancers* [online]. 2022, **14**(16) [vid. 2026-04-17]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers14163975
- [148] BRÁZDOVÁ, Marie, Timo QUANTE, Lars TÖGEL, Korden WALTER, Christine LOSCHER, Vlastimil TICHÝ, Lenka ČINČÁROVÁ, Wolfgang DEPPERT a Genrich V. TOLSTONOG. Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(5), 1486–1500. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkn1085
- [149] 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* [online]. 2019, **21**(1) [vid. 2026-04-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010127
- [150] CIRIBILLI, Yari, Paola MONTI, Alessandra BISIO, H. Thien NGUYEN, Abdul S. ETHAYATHULLA, Ana RAMOS, Giorgia FOGGETTI, Paola MENICHINI, Daniel MENENDEZ, Michael A. RESNICK, Hector VIADIU, Gilberto FRONZA a Alberto INGA. Transactivation specificity is conserved among p53 family proteins and depends on a response element sequence code. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(18), 8637–8653. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt657

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A – adenin

ADH – alkohol dehydrogenáza

AFM – mikroskopie atomárních sil

Amp – Ampicilin

APS – peroxodisíran amonný

CD – jádrová doména

CDK – cyklin dependentní kinázy

CTD – C-terminální regulační doména

DBD – vazebná doména

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina

DTT – dithiothreitol

E – eluce

G – guanin

G4 – G-kvadruplexy

GAL – galaktóza

GOF – získ nových funkcí

HEPES – N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

His-tag – polyhistidinová kotva

IPTG – isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

K – kontrola

LEU – leucin

LOH – ztráta heterozygotnosti

OD – oligomerizační doména

p53-WT – protein p53 přirozeně se vyskytující, standardní protein

pb – párů bází

PCR – polymerázová řetězová reakce

pDNA – plazmidová deoxyribonukleová kyselina

pre-mRNA – prekurzorová mediátorová ribonukleová kyselina

R – purin

Rb – retinoblastový protein

RE – responzivní element

RLU – relativní jednotka světla

RNA – ribonukleová kyselina

SDS – PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SDS – dodecyl síran sodný

ssDNA – jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina

T – thymin

TAD – transaktivační doména

TBE – tris borát ethylendiamintetraoctová kyselina

Temedu – *N,N,N',N'*-tetramethylethan-1,2-diamin

TRP – tryptofan

UTR – nepřekládaná oblast

UV/VIS – ultrafialové/viditelné záření

W – adenin či thymin

Y – pyrimidin